UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE TOULOUSE

ANNÉE 1951 N° 132

Contribution à l'Etude du pouvoir antiseptique de certains dérivés sulfonés du Phénol, du Thymol et du Carvacrol

Renforcement par certains sels métalliques du pouvoir antiseptique du Phénol, du Thymolsulfonate et du Carvacrolsulfonate de Sodium

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

MENTION PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement en Mai 1951

par

Henri FENEYROU

PHARMACIEN

Diplômé des Instituts de Sérologie et d'Hydrologie

MEMBRES DU JURY

MM. CAUJOLLE, Président

DELAS, ANDRIEU, VINCENT — Assesseurs

Mme DULUCQ-MATHOU, Suppléant

AURILLAC
Imprimerie Moderne
1951

Contribution à l'Etude du pouvoir antiseptique de certains dérivés sulfonés du Phénol, du Thymol et du Carvacrol

RENFORCEMENT PAR CERTAINS SELS METALLIQUES DU POUVOIR ANTISEPTIQUE DU PHENOL, DU THYMOLSULFONATE ET DU CARVACROLSULFONATE DE SODIUM

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE TOULOUSE

ANNÉE 1951 N° 132

Contribution à l'Etude du pouvoir antiseptique de certains dérivés sulfonés du Phénol, du Thymol et du Carvacrol

Renforcement par certains sels métalliques du pouvoir antiseptique du Phénol, du Thymolsulfonate et du Carvacrolsulfonate de Sodium

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

MENTION PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement en Mai 1951

par

Henri FENEYROU

PHARMACIEN

Diplômé des Instituts de Sérologie et d'Hydrologie

MEMBRES DU JURY

MM. CAUJOLLE, Président

DELAS, ANDRIEU, VINCENT — Assesseurs

Mme DULUCQ-MATHOU, Suppléant

AURILLAC
Imprimerie Moderne
1951

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

Doyen	MM. LEFEBVRE
Assesseur	BRUSTIER
Doyens honoraires	GORSE, CALVET

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. RISPAL	MM. MERIEL	MM. RIBAUT
LAFFORGUE	VALLOIS	SERR

PROFESSEURS

Clinique de neurologie et de psychiatrie	MM. RISER
Clinique médicale	TAPIE, ROQUES
Clinique obstétricale	GUILHEM
Physiologie	SOULA
Clinique chirurgicale et du cancer	DUCUING
Physique biologique et médicale	BUGNARD
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	NANTA
Chimie et Toxicologie	BRUSTIER
Pathologie générale et médecine expérimentale	SENDRAIL
Clinique chirurgicale et gynécologique	LEFEBVRE
Anatomie	LAZORTHES
Histoire naturelle	DELAS
Clinique médicale infantile et puériculture	SOREL (R.)
Pharmacie	CAUJOLLE
Pathol. interne et clin. des maladies de la tuberculose.	MOREL
Bactériologie, hygiène, médecine sociale	ANDRIEU
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	VIRENQUE
Clinique des maladies des voies urinaires	FABRE (P.).
Matière médicale	VINCENT
Hydrologie thérapeutique et climatologie	MERIEL
Anatomie pathologique	FABRE (J.)
Clinique oto-rhino-laryngologique et chirurgie	CALVET
Clinique ophtalmologique	CALMETTES
Chimie biologique	VALDIGUIE
Médecine légale et du travail	PLANQUES
Histologie et embryologie	BROUSSY
Médecine sociale	BONHOURE
Thérapeutique	GADRAT
Pathologie chirurgicale	GRIMOUD
Stomatologie	CADENAT

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Anatomie	MM. COULOUMA
Physiologie	BAISSET

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie	MM. POULHES
Histologie	BIMES
Sciences Naturelles	BOUISSET
Bactériologie	Mme ENJALBERT
Chimie Biologique	MM. POLONOVSKI
Physique Médicale	AUVERGNAT
Pharmacie	COUTURIER
Chimie générale pharmaceutique	BLANC
Botanique	Mme DULUCQ-MATHOU

AGREGES

Médecine	MM. DARNAUD, GERAUD, DARDENNE, LAPORTE, BAUDOT.	Chirurgie	MM. RIEUNAU, DIEULAFE, DAMBRIN (P.)
Ophtalmologie			MM. DEODATI
Physique Médicale			MARQUES
Obstétrique			PONTONNIER
O. R. L.			CLAUX
Urologie			LHEZ

COURS COMPLEMENTAIRES

Cours d'obstétrique aux élèves sages-femmes	MM. GUILHEM
Chimie pathologique	VALDIGUIE
Chimie biologique	DOUSTE-BLAZY
Chimie minérale	BLANC
Physique pharmaceutique	AUVERGNAT
Dermatologie et syphiligraphie	BAZEX
Législation pharmaceutique	BOUISSET
Tuberculose	MOREL
Chirurgie pulmonaire	DAMBRIN (P.)
Parasitologie	BAUDOT
Cryptogamie	Mme DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique	MM. BLANC
Hydrologie et Géologie	ASTRE
Anatomie médico-chirurgicale	THOMAS
Pharmacodynamie médecine	BAISSET
Pharmacodynamie pharmacie	CAUJOLLE
Hygiène	LAPORTE
Urologie	LHEZ
Ophtalmologie	DEODATI
Neuro-Chirurgie	LAZORTHES
Mycologie	MORQUER
Psychiatrie	GAYRAL
Physiologie	COLOMBIES
Secrétaire de la Faculté	M. ARGILAS

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.
(Délibération en date du 12 mai 1891).

A MA FEMME

En faible témoignage de mon amour et de mon indéfectible attachement.

A MES TROIS ENFANTS

En gage de ma paternelle et immense affection.

A MES PARENTS

En reconnaissance pour leur constante sollicitude et en témoignage de mon inaltérable affection.

A MON BEAU-PERE

A MES SŒURS

et

A MON FRERE LE Dr JEAN FENEYROU

Ancien externe des Hôpitaux
Diplômé des Instituts d'Hydrologie et de Médecine légale

En témoignage des liens si chers qui nous unissent.

A MA BELLE-SŒUR

A MON BEAU-FRERE

MEIS ET AMICIS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY :

MONSIEUR LE PROFESSEUR F. CAUJOLLE,

Professeur de Pharmacie,

Inspecteur principal des Pharmacies,

Chevalier de la Légion d'honneur

Nous exprimons notre profonde gratitude pour le grand honneur qu'il nous fait aujourd'hui de présider cette thèse, dont il a suivi toute l'élaboration et qu'il nous a inspirée en tenant compte de nos préférences marquées pour les recherches d'ordre biologique.

Pour le bienveillant intérêt qu'il nous a toujours témoigné, qu'il reçoive ici l'hommage de notre respectueuse reconnaissance et de notre inaltérable souvenir.

A NOTRE JURY DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR ANDRIEU

Professeur de Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale

Notre vive reconnaissance pour l'accueil si bienveillant qu'il nous a réservé dans son laboratoire. En nous faisant l'honneur de faire partie de notre jury de thèse, il nous donne un nouveau témoignage de l'intérêt qu'il nous réserve. Nous le prions de vouloir bien agréer, avec tous nos remerciements, l'hommage de notre profond respect.

MONSIEUR LE PROFESSEUR DELAS

Professeur d'Histoire Naturelle

Nos sentiments de sincère gratitude pour ses directives éclairées. En nous permettant l'accès de son laboratoire et en manifestant à nos recherches un intérêt constant, il a grandement contribué à l'élaboration de notre travail. Nous lui exprimons ici l'hommage de notre respectueuse reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR VINCENT

Professeur de Matière médicale

Avec notre déférente gratitude pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie de notre jury de thèse.

MADAME LE PROFESSEUR AGREGE DULUCQ-MATHOU

Maître de Conférence d'Histoire Naturelle

Avec nos respectueux hommages.

A TOUS NOS MAITRES
DE LA FACULTE MIXTE
DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DE TOULOUSE

A Monsieur E. STANISLAS

Chef de Travaux d'Histoire Naturelle
Chargé de Cours à l'Ecole Dentaire

Notre fidèle souvenir et notre vive reconnaissance pour l'appui et les précieux conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer avec une rare complaisance.

INTRODUCTION

C'est dans le cadre très général de l'étude du pouvoir antiseptique des essences végétales, que vient s'intégrer la première partie de notre travail.

Dès la plus haute antiquité, les essences végétales furent employées par d'illustres thérapeutes, qui — tels GALIEN et DIOSCORIDE — accordèrent un large crédit à leurs propriétés antiseptiques.

La Renaissance et le Moyen Age donnèrent le jour à toute une série de préparations, ayant pour base des essences dissoutes dans des véhicules divers. Quelques-unes ont même surmonté l'épreuve du temps ; nous citerons le Vin aromatique, l'Alcoolat de FIORAVANTI, l'Eau de Mélisse des Carmes, le Baume Opodeldoch.

Mais l'emploi des essences demeura empirique jusqu'à la fin du XIX^e^ *siècle.*

Les premiers travaux vraiment scientifiques accomplis sur les causes du pouvoir antiseptique des essences végétales, naquirent avec l'ère pastorienne. Après (1) *JALAN DE LA CROIX, CHAMBERLAND, disciple immédidt de PASTEUR, rédige un « travail princeps », dont les résultats ouvrent de nouvelles perspectives. Les horizons s'élargissent ; le champ d'investigation s'étend par la découverte de nouveaux germes et par l'étude systématique de toute substance susceptible de contrecarrer l'action néfaste de ces agents microbiens. La clinique se propose, de plus en plus, d'atteindre le mal dans sa racine et de diriger son action contre les germes pathogènes organisés, qui, en passant dans la circulation sanguine, sont responsables de redoutables septicémies. Ainsi, peu à peu, se perfectionne l'étude des substances antiseptiques. Les essences sont l'objet de recherches plus approfondies. On essaie de faire des rapprochements entre leur activité antiseptique et la structure chimique de leurs constituants. Des recherches très poussées sont poursuivies dans ce sens en* 1918, *par CAVEL* (6), *puis surtout l'Ecole de Lyon avec*

MOREL et ROCHAIX (27-28-29-30). *Peu à peu, on se préoccupe surtout d'établir des corrélations entre la nature chimique des essences et leurs activités biologiques. De suite, on se heurte à la prodigieuse diversité de leurs constituants. Chacun d'eux est systématiquement soumis à une étude approfondie. Parmi les principaux, nous citerons : les Alcools, les Carbures, les Aldéhydes et Cétones, les Acides et Lactones, les Esters et Ethers-Oxydes, enfin les Phénols. Ceux-ci ont un pouvoir antiseptique très élevé. Les essences de thym doivent une grande partie de leur activité germicide, soit au thymol, soit au carvacrol. Ces deux derniers produits ont, depuis quelque temps, retenu tout spécialement l'attention des chimistes. Déjà, CHAMBERLAND* (12), *CADEAC et MEUNIER* (5), *puis d'autres auteurs modernes, GATTEFOSSE* (24), *MARTINDALE, etc..., avaient pressenti la place spéciale qu'il fallait leur réserver. MOREL et ses élèves ont donné des résultats probants en faveur de l'activité germicide du thymol et du carvacrol.*

L'historique de telles recherches met bien en relief le processus des différentes étapes qui, les unes après les autres, se font suite dans le temps. Après la période empirique, arrive celle des chercheurs : on essaie de déterminer les causes de l'activité antiseptique des essences. Quelques constituants principaux semblent, de prime abord, seuls responsables de cette dernière. Puis, dans une troisième étape, les recherches s'intensifient en profondeur : on se demande si ce pouvoir germicide n'est pas dû à une fonction chimique spéciale. On isole à l'état de pureté de nouveaux constituants et on poursuit systématiquement leur étude chimique, toxicologique et bactériologique. Le professeur CAUJOLLE entreprend toute une série de recherches dans ce sens ; c'est sur son conseil que nous nous sommes plus spécialement arrêtés à l'étude des dérivés sulfonés du thymol et du carvacrol, produits de faible pouvoir antibiotique, dont nous avons cherché à exalter l'activité, par appoint de substances auxiliaires. M. le professeur CAUJOLLE nous a suggéré d'adjoindre aux thymolsulfonates et carvacrolsulfonates de sodium, divers ions métalliques à de très minimes concentrations.

BUFFON conseillait souvent de « rassembler des faits pour avoir des idées ». Nous avons voulu rassembler des faits pour contrôler cette hypothèse et nous élever ainsi de la « conception théorique qui imagine à l'expérience qui démontre », car, comme l'a dit PASTEUR :

« Le plus grand dérèglement de l'esprit est de croire les choses parce qu'on veut qu'elles soient. »

Nos conclusions sont une preuve que nos espoirs n'ont pas été déçus.

Pour cette étude des métaux, nous avons limité notre champ d'expériences à trois substances chimiques : le phénol, le thymolsulfonate et le carvacrolsulfonate de sodium. Sur chacune d'elles, nous avons successivement essayé l'influence des ions Cu^{++}, Mn^{++} et

Ag+. Les résultats remarquables qui sont tout particulièrement à l'actif de ce dernier métal, reflètent tout l'intérêt que présente cette question ; ils paraissent solliciter de nouveaux travaux dont ils ouvrent les voies, en permettant, semble-t-il, un élargissement des conclusions.

***

Notre travail comporte trois parties :

— Dans une première, nous avons brièvement exposé les propriétés chimiques et toxicologiques du thymol, du carvacrol et de leurs dérivés (les thymolsulfonates et les carvacrolsulfonates de sodium), à l'étude desquels nous nous sommes plus particulièrement arrêtés.

— Nous avons ensuite exposé, dans la deuxième partie, les différentes techniques proposées pour l'étude du pouvoir antiseptique des substances antimicrobiennes. Le protocole d'expérimentation, finalement adopté pour nos multiples essais bactéricides et bactériostatiques, a été décrit avec les détails nécessaires.

— Enfin, la dernière partie, de loin la plus importante, fera un large exposé de nos recherches personnelles et des conclusions qui s'en dégagent.

***

Il nous est tout particulièrement agréable ici, de remercier vivement MM. les professeurs ANDRIEU et DELAS pour le bienveillant accueil qu'ils nous ont réservé dans leurs laboratoires, et surtout, pour leurs directives éclairées.

Nos remerciements iront également, d'une part, à M. STANISLAS, chef de travaux pratiques d'Histoire Naturelle à la Faculté de Pharmacie, pour les conseils judicieux qu'il n'a cessé de nous prodiguer avec une courtoisie exceptionnelle, et, d'autre part, à Mme PYRONNET, pharmacienne, dont le dévouement a été pour nous un précieux secours.

PLAN GÉNÉRAL

Première Partie

Etude chimique et Toxicologique des Thymolsulfonates et des Carvacrolsulfonates

1re section : ETUDE DU THYMOL ET DU CARVACROL

2e section : ETUDE DES THYMOLSULFONATES ET DES CARVACROLSULFONATES

Deuxième Partie

Les Techniques

1re section : NOTIONS GENERALES

2e section : TECHNIQUES POUR L'ESSAI « IN VITRO » DES SUBSTANCES ANTIMICROBIENNES

I. — Description des différentes méthodes proposées.

II. — Protocole d'expérimentation adopté pour nos essais :

A. — Préparation des milieux de culture.
B. — Préparation des solutions d'antiseptiques.
C. — Préparation des suspensions microbiennes.
D. — Matériel d'expérience.
E. — Techniques utilisées pour nos essais.

Troisième Partie

Résultats expérimentaux

1re section : POUVOIR ANTISEPTIQUE DE CERTAINS DERIVES SULFONES DU PHENOL, DU THYMOL ET DU CARVACROL

2e section : RENFORCEMENT DU POUVOIR ANTISEPTIQUE DU PHENOL, DU THYMOLSULFONATE ET DU CARVACROLSULFONATE DE SODIUM, PAR LES SELS METALLIQUES

Paragraphe premier : Renforcement du pouvoir bactéricide.
Paragraphe deuxième : Renforcement du pouvoir bactériostatique.

CONCLUSIONS GENERALES

PREMIERE PARTIE

Etude Chimique et Toxicologique des Thymolsulfonates et des Carvacrolsulfonates

Les thymolsulfonates et les carvacrolsulfonates sont les sels des acides correspondants, acides thymolsulfonique et carvacrolsulfonique, eux-mêmes préparés à partir du thymol et du carvacrol.

Nous devons donc, dans un premier chapitre, étudier sommairement les caractéristiques de ces deux corps, au double point de vue chimique et toxicologique ; puis, dans un deuxième chapitre, nous nous étendrons davantage sur les propriétés correspondantes des thymolsulfonates et des carvacrolsulfonates, qui constituent le principal objet d'étude de nos travaux.

PREMIERE SECTION

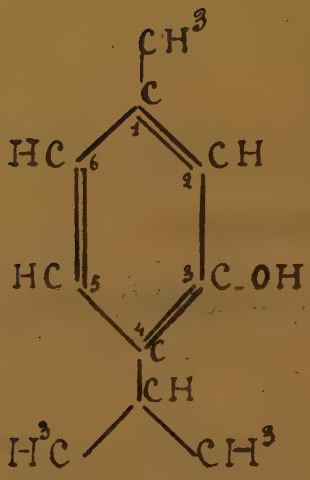
Etude du Thymol et du Carvacrol

Chapitre premier

ETUDE CHIMIQUE

I. — LE THYMOL

Le thymol, de formule brute : $C^{10}\ H^{14}\ 0$, répond à la formule ci-après.



On le nomme encore :

— acide thymique,

— ou para-isopropylmétacrésol,

— ou méthyl[1]-isopropyl[4]-phénol[3].

On le trouve, à l'état naturel, dans le thym, l'origan (Labiées), associé au para-cymène, à plusieurs terpènes et souvent à son isomère le carvacrol.

A. — *Préparation :*

On peut l'obtenir :

— soit par extraction de l'essence de thym,

— soit par synthèse.

1° Extraction à partir de l'essence de thym. — C'est la méthode de choix, assurant un rendement qui est rarement inférieur à 40 %, quand on utilise des essences pures. Les plus riches sont les essences de thym d'origine marocaine et espagnole.

Pour extraire le thymol de l'essence, on utilise la propriété que possède la fonction phénol d'être soluble dans les lessives alcalines. L'essence est traitée par de la lessive de soude concentrée à 10 ou 20 %. On obtient des thymolates et des carvacrolates alcalins, qui passent en solution. On étend d'eau chaude pour diminuer la concentration en phénates alcalins du milieu. Ainsi, les terpènes dissous dans la soude à la faveur de la haute concentration des phénates, se séparent ; ils surnagent. On décante la partie de l'essence non dissoute et la solution alcaline est agitée avec de l'éther, pour enlever toutes les traces de substance non phénolique. On ajoute de l'HCL (en présence d'eau glacée pour éviter l'échauffement), jusqu'à neutralisation. Le thymol précipite sous forme d'une huile. Ce thymol brut est ensuite distillé et on conserve ce qui passe entre 220° et 240°. On le purifie enfin, par cristallisation dans l'acide acétique cristallisable, ou par glaçage.

2° Synthèse. — On peut aussi préparer le thymol par synthèse :

— soit à partir du cymène, en employant comme matière première le résidu de la fabrication de la pâte à papier,

— soit à partir de menthol ou de la menthone,

— soit à partir du métacrésol,

— soit à partir de l'aldéhyde cuminique,

— soit à partir de l'alcool isopropylique et du benzène.

Mais la plus grande partie du thymol provient de l'extraction des essences naturelles.

B. — *Propriétés :*

Le thymol se présente sous forme de gros cristaux monocliniques ou hexagonaux, incolores, d'odeur caractéristique et brunissant à l'air. Il est à peine soluble dans l'eau (une partie pour 1.200 à + 15°), très soluble dans l'alcool, l'éther, l'acide acétique, le chloroforme et l'éther de pétrole. La solution dans l'eau est neutre au tournesol.

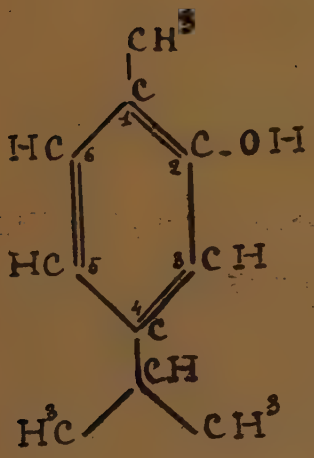
Les lessives alcalines donnent des thymolates alcalins, permettant de préparer des éthers-oxydes du thymol.

L'acide sulfurique fumant donne un mélange d'acides thymol-sulfoniques, dont les sels ont fait l'objet de nos recherches. Aussi les étudierons-nous à part.

Toujours par sa fonction phénol, le thymol se combine aux alcools. Le chlore et le brome donnent des produits de substitution puissamment antiseptiques. Soumis à l'action de Co^2 en présence de Na, il se transforme en acide thymolique.

On peut faire un dosage du thymol par colorimétrie.

II. — *LE CARVACROL :*



Le carvacrol est un isomère du thymol : l'oxydrile phénolique est situé en para par rapport à la chaîne méthylée. On l'appelle encore :

— para-isopropyl-ortho-crésol,
— ou méthyl[1]-isopropyl[4]-hydroxy[2]-benzène,
— ou cymophénol,
— ou oxycymène.

A l'état naturel, on le trouve dans l'essence de certaines Labiées, notamment dans l'essence d'origan (Origanum hirsutum), où il existe dans la proportion de 80 %, et dans celle de sarriette et de serpolet.

A. — *Préparation :*

1° Son extraction à partir des essences est semblable à celle du thymol ;

2° La synthèse est possible à partir du cymène, du camphre, de la carvone et de l'alcool isopropylique.

B. — *Propriétés :*

Le carvacrol est un liquide huileux, épais, incolore, brunissant à l'air et à la lumière, très peu soluble dans l'eau, légèrement soluble dans l'alcool et l'éther.

La réduction conduit à des corps différents selon le procédé employé. L'oxydation par le mélange chromique fournit la thymoquinone-carvacroloquinone.

Les acides minéraux (chlorhydrique et sulfurique) donnent des dérivés sulfonés et chlorés. Avec l'acide sulfurique, on obtient notamment l'acide carvacrolsulfonique, dont le sel sera étudié plus en détail.

Comme pour le thymol, on peut effectuer par colorimétrie un dosage du carvacrol.

Chapitre deuxième

ETUDE TOXICOLOGIQUE

MM. F. Caujolle et C. Franck ont étudié comparativement les toxicités du thymol et du carvacrol.

La différence de toxicité existant entre les isomères de position est, en effet, une notion actuellement bien établie en pharmacodynamie. Cette donnée se trouve-t-elle, en l'occurence, infirmée ou confirmée ? Il était intéressant de le vérifier.

Nous ne décrirons pas en détail le processus d'expérimentation qui a été suivi par ces auteurs. Toutes les expériences ont été réalisées chez le chien chloralosé (0.10 à 0.12 gramme par kilogr.). Pour chaque corps, six animaux furent utilisés. On enregistrait la pression artérielle, soit carotidienne, soit fémorale, au moyen d'un kymographe de Ludwig, et les mouvements respiratoires, soit au moyen d'un pneumographe de Paul Bert, de Marey ou de Tournade, soit par inscription des variations de pression intrachéale.

Le thymol était employé en solution dans l'huile d'olive à 1 gramme pour 10 cm^3.

Dans ces conditions, la dose toxique par kilogramme d'animal est, pour le thymol (0.15 gr.), deux fois moins grande que pour le carvacrol (0.31 gr.). Le thymol provoque une apnée définitive à la dose de 0.10 gr. par kilogr. ; le carvacrol déclenche une apnée primitive, suivie d'une reprise de la respiration, qui se poursuit jusqu'au moment de la mort.

DEUXIEME SECTION

Etude
des Thymolsulfonates et des Carvacrolsulfonates

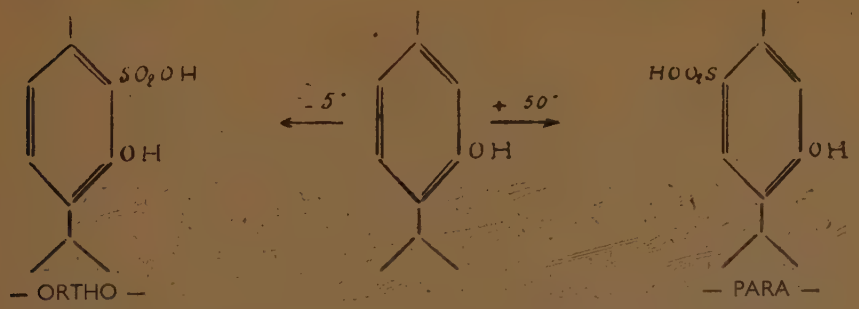
Chapitre premier

ETUDE CHIMIQUE

I. — *THYMOLSULFONATES :*

La préparation des thymolsulfonates nécessite, au préalable, celle des acides correspondants : acides thymolsulfoniques.

Par action directe de l'acide sulfurique sur le thymol, Engelhardt et Latschinov ont obtenu deux dérivés monosubstitués. A — 5°, la sulfonation s'effectue en ortho par rapport à l'oxydrile phénolique, avec un rendement médiocre ; à 50°, la sulfonation se fait en para, avec d'assez bons rendements, de l'ordre de 60 à 70 % du thymol mis en œuvre.



A. — *Préparation :*

Pour préparer cet acide, on prend, par exemple, 60 gr. de thymol que l'on fait fondre au B. M., vers 51° ; à cette température, on verse

en agitant 40 gr. d'acide sulfurique à 66° B. On laisse en contact : la température monte à 65°-70°. On la maintient une heure, en chauffant au B. M., mais en ayant soin d'agiter.

L'acide thymolsulfonique se prend, par refroidissement, en masse violette, que l'on dissout ensuite dans l'eau chaude additionnée de 2 à 3 % de noir. Par filtration, on sépare la solution du thymol qui n'a pas été décomposé. A ce stade, deux méthodes sont possibles :

1° On peut dissoudre dans l'éther et neutraliser la solution par du carbonate de baryum. On évapore. On a obtenu du thymolsulfonate de baryum, se présentant sous l'aspect de beaux cristaux, mélangés à des lamelles issues des dernières eaux-mères. Puis, on transforme ces cristaux et leurs eaux-mères en sel de sodium ou de potassium.

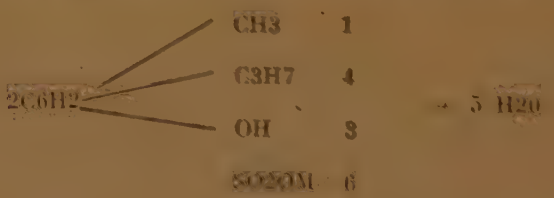
2° On peut encore, après la filtration, faire recristalliser en concentrant les eaux-mères sous un certain vide. Dans ce cas, le rendement atteint 61 %.

L'acide thymolsulfonique est mis en solution dans l'eau et neutralisé par addition de carbonate de sodium, jusqu'à cessation de précipité, par des essais à la touche. Le liquide concentré sous vide est abandonné à la cristallisation.

Nota. — Selon qu'on fait agir l'acide sulfurique sur le thymol à la température de — 5° ou de + 50°, on obtient le dérivé en ortho ou en para.

B. — *Propriétés :*

Les sels de sodium et de potassium de l'acide p. thymolsulfonique donnent de très beaux cristaux, répondant à la formule suivante :



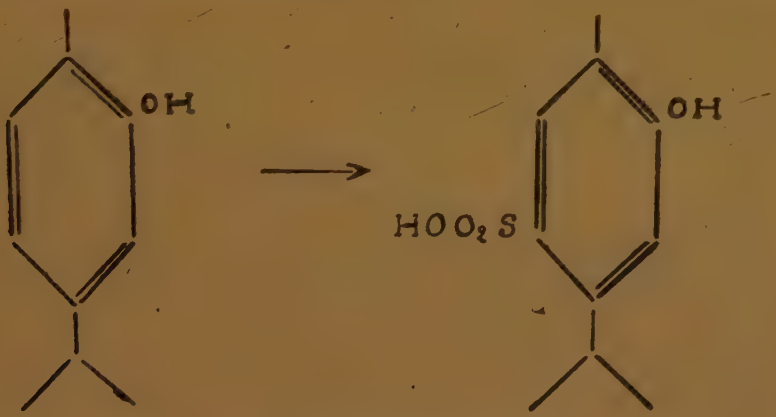
Ces cristaux sont très facilement solubles dans l'eau ; leurs solutions, incolores au début, ont tendance à brunir avec le temps.

Le thymolsulfonate de sodium a un point de fusion de 166°-167°. Il est soluble dans l'eau et l'alcool.

Le thymolsulfonate de calcium, qui se prépare de même, mais avec du carbonate de calcium, est soluble dans l'eau, l'alcool et l'éther. Son point de fusion est de 156°-157°.

II. — *CARVACROLSULFONATES :*

Parallèlement à l'acide thymolsulfonique, l'acide carvacrolsulfonique se prépare par action directe de l'acide sulfurique, au-dessus de 50°, sur le carvacrol. On obtient le dérivé monosulfonique en para par rapport à l'oxydrile phénolique.



Il faut éviter une température trop élevée, car au-dessus de 100°, on aurait formation supplémentaire d'un acide carvacrol-disulfonique.

A. — *Préparation :*

On prend un ballon à trois tubulures, muni d'un agitateur, d'un thermomètre plongeant dans la masse et d'un tube à dégagement pour SO^2. On chauffe au B. M., de manière à avoir une température de + 50°. On introduit alors :

Carvacrol	115 gr.
Acide sulfurique	115 »

Un brunissement instantané se produit. On chauffe pendant trois heures à 50°. Le tout est ensuite traité à l'eau ; on chauffe légèrement. Puis, on ajoute, avec précaution, du carbonate de calcium : soit 110 gr. On agite pour faciliter le dégagement du CO^2 : dans cette opération, on élimine l'excès d'acide sulfurique qui est précipité sous forme de sulfate de calcium ; quant à l'acide carvacrolsulfonique, il est entièrement transformé en carvacrolsulfonate de calcium. On épuise alors trois fois par l'éther de pétrole : on récupère ainsi 23 gr. de carvacrol. La partie soluble dans l'eau est alors traitée par le carbonate de sodium, jusqu'à cessation de précipitation (essai à la touche). On utilise environ 34.4 gr. de carbonate

de sodium. La solution filtrée est évaporée sous vide, au B. M., jusqu'au poids de 165 gr. ; elle est ensuite abandonnée à la cristallisation.

B. — *Propriétés :*

Le carvacrolsulfonate de sodium cristallise en aiguilles très solubles dans l'eau.

Le carvacrolsulfonate de calcium est obtenu par le procédé que nous venons de décrire. Nous avons vu, en effet, que, dans la préparation du cravacrolsulfonate de sodium, on passait par le stade du sel de calcium, qui est soluble dans l'eau. Après l'élimination du carvacrol, non engagé, par l'éther de pétrole, la solution sous-jacente est constituée par une solution aqueuse de carvacrolsulfonate de calcium que l'on fait cristalliser.

Ce carvacrolsulfonate de calcium est très soluble dans l'eau.

Chapitre deuxième

ETUDE TOXICOLOGIQUE

La toxicité des p-thymolsulfonates et des p-carvacrolsulfonates a été encore étudiée par MM. F. Caujolle et C. Franck, selon la technique de perfusion intraveineuse lente, déjà adoptée et décrite pour l'étude similaire de la toxicité du thymol et du carvacrol.

Voici les résultats obtenus, par ces auteurs, pour ces différents sels :

I. — *THYMOLSULFONATES :*

Le sel de sodium est très peu toxique (dose léthale en grs. par kilogr. : 3.95), tandis que le sel de potassium a une dose léthale de 0.378. La toxicité du sel de potassium doit être rapportée à l'élément métallique : l'ion potassium à concentration suffisante, arrêtant le cœur en diastole.

Ces expériences démontrent que la p-sulfonisation atténue considérablement la toxicité générale du thymol ; enfin, il est remarquable

d'observer que le pouvoir convulsivant propre à de nombreux phénols, et si net avec le thymol, ne se retrouve pas avec les p-thymolsulfonates de sodium et de potassium, bien que ces corps renferment encore un oxydrile phénolique libre.

II. — *CARVACROLSULFONATES :*

Ici encore, l'expérimentation démontre que la toxicité du p-carvacrolsulfonate de sodium est notablement inférieure à celle du p-carvacrolsulfonate de potassium, dont l'agressivité, se traduisant par l'arrêt brutal du cœur en diastole, relève, de toute évidence, de l'ion potassium. Donc, la toxicité du carvacrol est atténuée par la p-sulfonation, et le sel de sodium peut être considéré comme dépourvu de toxicité.

La sulfonation détoxique plus intensément le thymol que le carvacrol : ainsi, le thymol est 26 fois plus toxique que le sel de sodium de son dérivé sulfoné, tandis que le même coefficient relatif au carvacrol n'est que de 14. Ses effets sont parallèles à ceux de l'éthérification, qui conduit à des éthers de carvacryle plus toxiques que les éthers de thymyle correspondants, bien que le carvacrol soit 2 fois moins toxique que le thymol.

Enfin, le cas particulier du thymol et du carvacrol montre que la détoxication d'une molécule par sulfonation d'un noyau ou blocage d'un oxydrile phénolique est, quantitativement, sous la dépendance des isoméries de structure.

DEUXIÈME PARTIE

LES TECHNIQUES

L'étude des techniques modernes, utilisées pour déterminer la valeur antimicrobienne d'une substance, ne peut être abordée avec méthode que si l'on a, au préalable, envisagé certaines notions générales intéressant, d'une part, les différents degrés que peut présenter cette activité antiseptique, et, d'autre part, les conditions qui sont susceptibles de l'influencer.

Après l'examen des différentes techniques proposées, nous décrirons, avec détails, le protocole d'expérimentation que nous avons adopté pour nos essais.

Le plan général de cette deuxième partie sera donc le suivant :

1re section : Notions générales.

2e section : Les techniques :

— Description des différentes méthodes proposées.

— Protocole d'expérimentation adopté pour nos essais.

PREMIERE SECTION

Notions générales

L'action qu'une substance antiseptique est susceptible d'exercer sur une bactérie sensible à son action peut être bactériostatique ou bactéricide.

La première, encore appelée antigénétique, se manifeste par l'arrêt du potentiel de reproduction du germe mis à son contact ; le micro-

organisme n'est pas tué, mais simplement mis en sommeil ; reporté dans un milieu neuf, il reprend sa vie normale. Il y a, au contraire, action bactéricide ou antibiotique lorsque le germe est tué, de telle sorte que, même reporté ultérieurement dans un milieu où se trouvent réalisées les conditions optima de vie des microbes, il ne peut plus reprendre sa vie normale et se développer à nouveau. Bien entendu, il n'y a pas une cloison étanche entre ces deux manifestations de l'activité antimicrobienne d'une substance et souvent, pour un même produit, l'on passe de l'une à l'autre en augmentant simplement la concentration du milieu en désinfectant. Chacune de ces actions est liée à la sensibilité propre du germe, d'une part, à la dose d'antibiotique utilisée, d'autre part. Par exemple, pour un germe donné qui n'a jamais eu de contact avec la substance antiseptique, X doses de celle-ci auront une action bactériostatique, 20 X ou 50 X doses une action bactéricide.

Quel est le mécanisme de cette action antibactérienne ? Nous sortirions du cadre de notre travail en essayant d'approfondir ce sujet. On peut tout de même admettre que, *in vivo*, le processus d'activité d'une substance antiseptique vis-à-vis d'un germe pathogène comporte, dans un premier temps, une action directe du désinfectant sur le microbe lui-même ; il pourrait en résulter, pour ce dernier, soit une modification de sa composition, entravant son développement ultérieur, soit une sensibilisation accrue aux procédés de défense de l'organisme, soit une altération profonde et irréversible, entraînant sa destruction. Puis, dans un deuxième temps, interviendraient les processus de défense naturelle de l'organisme infecté, notamment la phagocytose et la formation des anticorps spécifiques.

Ces quelques notions très générales nous amènent à préciser la nature de certaines conditions qui sont susceptibles d'influencer toute intervention antimicrobienne.

Pour se manifester, une action antiseptique nécessite :

— un organisme témoin (le microbe),
— un désinfectant,
— un milieu de contact.

1° Il est évident que le germe aura une puissance de résistance variable, selon la quantité des individus entrant en jeu et leur nature propre ;

2° D'un autre côté, la substance antiseptique sera plus ou moins agressive pour le germe, selon qu'elle présentera ou non certaines propriétés physiques ou chimiques favorables : solubilité dans l'eau, liposolubilité, et surtout degré d'ionisation. A ce sujet, on avait déjà constaté, par exemple, que certaines solutions aqueuses de différents sels mercuriques ne présentaient pas une action antibiotique proportionnelle à leur richesse en mercure, mais à leur teneur en ions Hg^{++}. Dans le même ordre d'idées, on peut citer les expériences de Maillard, qui datent de 1898, et dont voici un résumé succinct.

Dès cette date, cet auteur a cherché à modifier l'agressivité d'un même sel en faisant varier son ionisation. Pour cela, il a ajouté à des solutions de sels à cathion toxique, celles d'autres sels de même anion, mais à cathion non toxique. Ainsi, à une solution aqueuse diluée de sulfate cuivrique, MAILLARD ajoute So^4Na^2 qui sera dissous en quantités croissantes. D'après la loi d'action de masse, si nous représentons par C_1 C'_1 C''_1 les concentrations en molécules So^4Cu non dissociées et en ions So^{4--} et Cu^{++}, nous avons les relations suivantes :

$$a)\ \underset{C_1}{So^4Cu} \rightleftarrows \underset{C'_1}{So^{4--}} + \underset{C''_1}{Cu^{++}}$$

et $b)$ $$\frac{C_1}{C'_1 \quad C''_1} = K^1$$

De même, l'ionisation de So^4Na^2 se définit par les relations :

$$a)\ \underset{C_2}{So^4Na^2} \rightleftarrows \underset{C'_2}{So^{4--}} + \underset{C''_2}{^2Na^+}$$

et $b)$ $$\frac{C_2}{C'_2 \quad C''_2} = K^2$$

où C_2 C'_2 C''_2 représentent les concentrations en molécules So^4Na^2 non dissociées et en ions So^{4--} et Na^+.

Le fait d'ajouter So^4Na^2 à une solution de So^4Cu augmente la concentration en ions So^{4--} ; dans la relation :

$\frac{C_1}{C'_1 \quad C''_1} = K^1$, le terme C'_1 augmente de C'_2 ; pour que l'égalité soit vérifiée, il faut donc que le terme C''_1 diminue de manière à ce que l'on ait toujours :

$$C'_1 \ C''_1 = (C'_1 + C'_2) \ C''_1$$

Donc l'addition de So^4Na^2 à une solution de So^4Cu fait rétrograder la dissociation de ce dernier et, partant, diminue la concentration en ions cuivriques. Avec ces solutions à teneur amoindrie en ions cuivrique, MAILLARD observe une diminution de l'agressivité vis-à-vis des germes, des micro-organismes et notamment du Penicillium glaucum.

3° Enfin, la nature du milieu servant d'intermédiaire entre l'antiseptique et l'organisme témoin exerce aussi une influence sur le processus de désinfection par ces deux facteurs. Son pH notamment doit être compatible avec le bon développement du germe étudié.

De ces quelques notions générales préliminaires, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° Pour déterminer la valeur antimicrobienne d'une substance, nous devrons caractériser, d'une part, son pouvoir antigénétique et, d'autre part, son activité antibiotique ;

2° Pour être employé en clinique, un médicament doit se montrer actif sur le germe pathogène et peu toxique pour les cellules de l'hôte. Cette constatation découle du mécanisme d'action que paraît suivre toute substance antiseptique dans sa lutte contre les microbes ;

3° Enfin, les techniques permettant de déterminer la valeur antimicrobienne d'une substance devront tenir compte des caractères respectifs de l'organisme témoin, du désinfectant et du milieu de contact. Leur caractéristique essentielle sera de placer germe et antibiotique dans des conditions normales de croissance pour l'un et d'activité pour l'autre.

DEUXIEME SECTION

Les Techniques

Dans la pratique, les méthodes utilisées pour l'essai *in vitro* d'une substance antimicrobienne se proposent de déterminer la plus petite dose de cette dernière à mettre en œuvre, soit pour inhiber le développement ultérieur des germes (doses antigénétiques), soit pour les détruire définitivement (doses antibiotiques). Par ces méthodes, on constate donc la phase finale de l'action désinfectante.

D'où, deux grands groupes de méthodes ayant respectivement pour but :

1° La mesure de la valeur antigénétique : ce sont les plus simples, puisque deux facteurs seulement sont ici à considérer : les microbes et la substance antimicrobienne ; le milieu où s'effectue le contact est toujours un milieu optimum pour la croissance des germes ;

2° La mesure de la valeur antibiotique : ici, pour vérifier le résultat, on doit transporter les germes traités par la substance antiseptique, dans un milieu de culture neuf et propre à leur développement éventuel (subculture). On vérifie ainsi l'intensité de l'action antimicrobienne, qui dépend de la substance éprouvée, du milieu et de la nature du germe.

1° DESCRIPTION DES DIFFERENTES METHODES PROPOSÉES :

I. — Procédés de mesure du pouvoir antigénétique (méthodes statiques) :

Dans toutes ces techniques, les micro-organismes restent au contact du milieu contenant la substance antiseptique : on note simplement la concentration la plus faible, pour laquelle la culture n'a pas lieu. On n'a donc pas à faire de report dans un milieu de culture neuf : d'où le nom de méthodes statiques donné à ces procédés de mesure. Le but poursuivi est, en somme, l'arrêt de la reproduction.

Le contact des deux facteurs qui sont ici en présence (microbes et substance antiseptique) pourra se faire :

— soit en milieu solide,
— soit en milieu liquide.

A. — Procédés de contact en milieu solide :

Voici le *modus operandi :*

— Liquéfier des culots de gélose de 10 cc. par exemple.
— Au cours du refroidissement et avant la solidification, c'est-à-dire vers 35°, verser la solution antiseptique respectivement dans chaque tube, en quantités décroissantes, par exemple :

1 cc. — 0 cc. 8 — 0 cc. 6 — 0 cc. 1

Ces chiffres sont à déterminer et à noter pour chaque germe. En outre, il ne faut pas oublier de mettre un tube témoin contenant le solvant sans l'antiseptique.

— Bien mélanger pour homogénéiser parfaitement. Cette précaution est surtout importante pour les mélanges dont le véhicule n'est pas miscible au bouillon.
— Verser en boîtes de Petri, en couche uniforme et attendre la solidification.
— Ensemencer, à la pipette Pasteur, VI gouttes de culture microbienne (par ex. Staphylocoque) : étaler sur la surface de la gélose avec un agitateur coudé.
— Mettre à l'étuve à 37° et laisser en contact 24 heures et plus, si cela est nécessaire.
— Chaque jour, prélever une colonie pour examen microscopique, qu'on renouvelle pendant huit jours.

B. — Procédés par contact en milieu liquide :

a) Préparer une série de tubes de bouillon ou d'eau peptonée de même contenance ; verser dans chaque tube des quantités décroissantes de la solution antiseptique à étudier. Mélanger pour bien homogénéiser.

— Ensemencer les tubes à la pipette avec une culture microbienne en bouillon de 24 heures.

— Mettre à l'étuve à 37°, pendant 24 heures ou d'autres temps de contact.

— Noter la concentration la plus faible, pour laquelle la culture n'a pas lieu.

b) Un autre procédé constitue la méthode au fil : son principe sera exposé plus loin (méthode des porte-germes, pour la détermination de la valeur antibiotique). Le processus suivi est ici le même que celui employé dans ce dernier cas, avec cette seule différence que le fil reste plongé ici dans la solution antiseptique, puisqu'il est inutile d'effectuer un report dans une subculture.

c) Technique de Régnier et Lambin :

Ces auteurs estiment qu'il est absolument nécessaire de connaître le nombre de germes mis en présence de la solution antiseptique. Voici comment ils opèrent pour déterminer la dose antigénétique d'une substance :

« La solution de la substance antiseptique et la suspension du germe choisi pour l'essai, ayant été préparées, on calcule, d'une part, la quantité de suspension microbienne à introduire dans le milieu, pour y assurer une concentration en germes de 10 millions par centimètre cube, et, d'autre part, les quantités de solutions désinfectantes à mettre en expérience. Ces diverses valeurs étant établies, on dispose une série de tubes à essai, contenant chacun 2 cc. 5 de bouillon peptoné, salé à concentration double. On y ajoute la quantité de suspension bactérienne suffisante pour apporter, dans chaque tube, 50 millions de germes, puis, aussitôt après, des quantités croissantes de la solution antiseptique étudiée. On complète au volume constant de 5 cc. avec de l'eau distillée stérile, et on agite chaque tube. On a donc des tubes de bouillon contenant, par centimètre cube, 10 millions de germes et des quantités croissantes de solution antiseptique. Le bouillon double, dilué de moitié, se trouve ramené à la concentration normale. Chaque tube est capuchonné et la série est laissée quinze jours à la température du laboratoire. Les tubes sont alors placés quatre jours à l'étuve à 37°. On effectue la lecture au bout du vingtième jour. »

II. — Procédés de mesure de la valeur antibiotique (méthodes cinétiques) :

Principe. — Les micro-organismes sont uniformément répartis dans des tubes contenant des solutions de titre croissant en désin-

fectant. Après un séjour déterminé et généralement court à l'étuve, on fait dans chaque tube un prélèvement qui est reporté dans des tubes correspondants, contenant un milieu de culture neuf (subculture). Ces tubes sont maintenus à l'étuve un temps suffisant et on note finalement la concentration minima pour laquelle la culture n'a pas lieu. Ces méthodes comportent donc un report dans un milieu de culture favorable ; pour cette raison, on les appelle : méthodes cinétiques.

Ici nous avons trois groupes de méthodes :

A. — Les méthodes des porte-germes, dans lesquelles les microbes sont fixés sur des objets inertes, puis immergés dans une solution antiseptique ;

B. — Les méthodes des suspensions, dans lesquelles les germes sont en suspension dans un liquide additionné d'antiseptique ;

C. — Les méthodes dans lesquelles on ensemence les germes sur un milieu nutritif solidifié : l'antiseptique est placé, soit directement au contact des germes qui se sont développés, soit introduit préalablement au développement des germes, dans le milieu de culture.

A. — Méthodes des porte-germes :

Principe. — On prend des objets inertes (fils de soie, etc.), sur lesquels on fixe les germes à détruire ; on soumet ces objets à l'action antiseptique des substances à étudier, soit par immersion dans des solutions à concentration variable de ces dernières, soit par passage dans une atmosphère de vapeurs antiseptiques (par ex. essences). Après un temps connu, on retire ces objets de la solution antiseptique ; on les débarrasse, par un traitement approprié, du désinfectant qu'ils ont pu entraîner, et enfin, on transporte ces porte-germes dans une subculture, pour assurer le développement des germes non détruits.

Tel est le principe de la méthode des fils de Koch et du procédé de mesure des grenats de Paul et Kronig.

Ces méthodes sont l'objet de critiques sérieuses :

1° On ignore le nombre de germes initiaux mis en expérience et, encore plus, la quantité de micro-organismes repiqués ;

2° Pour fixer ces derniers sur les porte-germes, les auteurs préconisent de les soumettre à une longue dessiccation : ce traitement, qui pourrait s'admettre sans gros inconvénient pour des germes sporulés, entraîne certainement un abaissement de la vitalité des germes, rendus ainsi plus sensibles à l'action nocive des substances antiseptiques.

Pour ces raisons, nous avons préféré utiliser pour nos essais la méthode des suspensions.

B. — Méthode des suspensions :

Principe. — On met en contact direct, dans un milieu liquide quelconque, la substance antiseptique et les germes à détruire ; après

un certain temps, on transporte une fraction du mélange dans une subculture et on regarde si les microbes ainsi déplacés se développent.

Le gros inconvénient de ce procédé est le suivant : en prélevant une fraction de la suspension bactérienne traitée par la substance antiseptique, pour la transporter dans la subculture, on entraîne nécessairement, en même temps, une petite quantité du désinfectant, qui peut suffire parfois à stopper le développement ultérieur des germes dans la subculture. Nous verrons toutefois, en décrivant dans le détail la technique de cette méthode. utilisée dans nos essais, qu'il est permis présentement, et à défaut d'autre, de la considérer comme une des meilleures.

D'ailleurs, de tous côtés, de multiples essais furent tentés, en vue de remédier à cette cause d'erreur. Ainsi naquit l'idée d'effectuer, dans chaque cas, un essai comparatif exactement semblable, avec un désinfectant pris comme étalon. On essaya, alors, des méthodes connues sous le nom de *méthodes du coefficient phénol,* dans lesquelles les résultats se trouvent donc exprimés en valeur relative.

— Technique du *coefficient* phénol de Rideal et Walker :

C'est une méthode d'essai comparatif, basée sur le procédé de suspension et consistant à déterminer la concentration du désinfectant étudié, capable de détruire une quantité donnée de germes, dans le même temps que pouvait le faire une concentration donnée de phénol. Le rapport entre les concentrations antibiotiques de la substance étudiée d'une part, et du phénol d'autre part, est appelée *coefficient phénol.* C'est la méthode à la goutte.

Par la suite, cette méthode originale des auteurs précités subit différentes modifications ; par exemple, l'adoption d'un temps constant pour l'essai et l'essai en présence de matières organiques. Mais c'est une méthode longue et dispendieuse, qui laisse d'ailleurs subsister certaines causes d'erreur, qu'elle prétend évincer ou du moins atténuer (par exemple : facteur température, temps de contact ou facteur microbien).

— Technique de Régnier et Lambin :

Récemment, ces deux auteurs ont essayé de mettre au point une méthode de détermination des pouvoirs antibiotiques, basée sur l'utilisation de suspensions microbiennes et donnant des résultats constants. Ils ont étudié dans ce but deux méthodes :

2° Technique directe et

2° Technique de centrifugation.

1° Technique directe :

Préalablement à l'essai, ils procèdent, à partir de la suspension microbienne, à une numération des germes. Dans ce but, après avoir titré à l'hématimètre de Malassez une suspension de levure de boulanger, ils mélangent un certain volume de cette dernière à un

volume également connu de suspension microbienne. Une goutte de ce mélange est étalée sur plusieurs lames, colorée, et enfin, on compte sur chaque lame la proportion relative des deux éléments. Ce facteur une fois précisé, ces deux auteurs ont étudié l'influence du milieu dans lequel s'exerce l'action antibiotique. Celle-ci peut s'exercer dans des milieux différents, notamment en eau distillée, en eau physiologique, en milieux albumineux, en bouillon peptoné salé (milieu complexe). Voici leur technique :

« On laisse en contact durant 15 minutes, dans un milieu déterminé, des quantités croissantes de la substance antiseptique et des quantités constantes de germes (500 millions par centimètre cube). Après ce temps, une quantité constante du mélange (1/10 de centimètre cube) est repiquée dans 5 cc. de milieu de subculture, afin de permettre le développement, dans ce milieu neuf, des germes restés vivants. Les tubes de subculture sont placés à l'étuve à 37°, jusqu'à ce que le nombre de tubes dans lesquels se développent les germes reste constant. L'avantage de cette méthode, qui donne des résultats d'une régularité satisfaisante, c'est qu'elle permet, dans une certaine mesure, de calculer l'erreur découlant de l'inconvénient déjà noté, du transport d'antiseptique dans les subcultures, puisque nous connaissons la concentration en germes. De ce fait, cette méthode nous met en mesure de déceler les cas où son application peut se trouver en défaut. D'une façon générale, les résultats les plus valables sont obtenus avec les substances très antibiotiques et très peu antigénétiques. Dans certains cas, on devra employer la technique de centrifugation. »

2° Technique de centrifugation :

Cette méthode est établie sur les mêmes bases que la précédente : elle n'en diffère que par le point suivant : après action de l'antiseptique, les germes traités, au lieu d'être directement réensemencés dans un milieu de subculture, sont séparés du milieu d'essai par centrifugation. On les lave ensuite plusieurs fois à l'eau distillée stérile, en les séparant chaque fois par centrifugation, et on les introduit finalement dans la subculture. Mais c'est une méthode de réalisation longue et assez difficile. En outre, l'acte même du lavage apporte, dans la notion du temps de contact, un facteur d'incertitude qui n'existait pas dans la première technique directe.

C. — Enfin, certaines méthodes utilisent des milieux solides :

Ces techniques qui sont, comme nous l'avons vu, utilisées comme tests de l'activité antigénétique, peuvent devenir des procédés de détermination de valeurs antibiotiques. Il suffit, pour cela, de transporter dans du bouillon nutritif les portions du milieu solide où le désinfectant a arrêté le développement des germes. Si ce milieu neuf pousse, c'est que les germes n'avaient pas été tués, mais simplement arrêtés dans leur prolifération. Si la culture est, par contre, négative, c'est qu'il y a bien eu action antibiotique.

2° PROTOCOLE D'EXPERIMENTATION ADOPTÉ POUR NOS ESSAIS :

A. — Préparation des milieux de culture :

Nous avons utilisé :

1° La gélose, pour les essais sur milieu solide ;
2° Le bouillon ordinaire, pour les essais bactéricides ;
3° L'eau peptonée, pour les déterminations bactériostatiques.

1° Milieu solide. — Pour les expérimentations sur milieu solide, nous avons employé la gélose. On prend des tubes stérilisés de gélose de 10 ou 15 cc., qu'on liquéfie au bain-marie. Au moyen de pipettes graduées, on incorpore les différentes doses de solution antiseptique et cela à la plus basse température possible avant la solidification. On homogénéise en faisant rouler les tubes entre les paumes des mains ; puis on verse en boîtes de Petri. Le couvercle doit laisser apparaître une petite ouverture permettant le passage de la vapeur d'eau, qui, sans cela, se condenserait sur le couvercle et gênerait l'observation de la surface de gélose. On ferme au moment de la solidification. Ces milieux en boîtes de Petri sont toujours préparés extemporanément. Les milieux spéciaux, nécessaires pour certains germes, ont été préparés selon les techniques qui leur sont propres (gélose ascite, bouillon glucosé, etc...)

2° Bouillon ordinaire. — Faire macérer, à froid, pendant 6 à 12 heures, dans 1.000 grammes d'eau, 500 grammes de viande de bœuf hachée et dégraissée. Exprimer le mélange. Répandre 10 grammes de peptone pancréatique à la surface. Laisser dissoudre. Puis ajouter 1 gramme de glucose et 20 grammes de carbonate de chaux. Faire bouillir 10 minutes. Filtrer jusqu'à clarification sur un papier filtre mouillé, pour débarrasser des traces de graisse ; plusieurs filtrations sont parfois nécessaires. Neutraliser alors avec une solution de lessive de soude au dixième jusqu'à réaction alcaline au bleu de Bromothymol (pH = 8,5 — teinte vert foncée), car le bouillon perd toujours un peu d'alcalinité au cours de la stérilisation. Stériliser 1 heure, à l'autoclave, à 110°. Répartir en tubes de 5 cc. et stériliser à nouveau à l'autoclave pendant une demi-heure à 115°.

Nota. — Pour le Colibacille, nous avons utilisé le bouillon lactosé, en tubes munis d'une cloche pour le dégagement des gaz.

3° L'eau peptonée. — Pour nos essais bactériostatiques, nous avons utilisé l'eau peptonée de formule suivante :

Peptone pancréatique	3 grs
Glucose (pour le Staphylocoque et le Loeffler)	0.40
ou Lactose (pour le Colibacille)	0.40
Chlorure de sodium	0.50
Eau distillée q. s. p.	100 cc.

L'eau peptonée ainsi obtenue est amenée à pH 7,3, en opérant, comme pour le bouillon, avec de la soude N/10, et en présence d'une solution de rouge neutre à 1 %. Ensuite, répartir en tubes et stériliser à l'autoclave.

B. — Préparation des solutions d'antiseptiques :

Pour obtenir les différentes concentrations d'antiseptiques nécessaires pour nos multiples essais, nous avons dû procéder de la façon suivante :

1° Obtenir des antiseptiques étudiés à l'état pur et vérifier cette pureté par des dosages appropriés ;

2° Préparer, à partir de ces corps, des solutions mères ;

3° Ramener extemporanément la concentration fixe de ces solutions à la valeur désirée, par mélange en quantités voulues avec le volume nécessaire d'une solution tampon.

1° *Préparation et contrôle de la pureté des antiseptiques étudiés.* — Sans entrer dans les détails de préparation et de contrôle de tous les corps expérimentés, nous allons nous borner, à titre d'exemple, à envisager :

— le phénol, parmi les antiseptiques, et
— l'argent, parmi les métaux.

a) *Phénol :* Le dosage s'effectue sur une prise d'essai comprise entre 5 et 30 cc. d'une solution aqueuse de phénol neige à une concentration voisine du millième. On utilise la méthode au bromate de potassium, préconisée tout d'abord par Koppeschaar et étudiée par Luce, pour le dosage de quelques médicaments phénoliques. Prendre, par exemple :

Solution phénolée	20 cc.
Solution de bromure au 1/3	10 cc.
Alcool à 95°	30 cc.
Solution de bromate N/10	5 cc.
Acide chlorhydrique au 1/10	10 cc.

Attendre 2 minutes, ajouter 10 cc. de la solution d'iodure de potassium au 1/10 et titrer l'iode mis en liberté par le thiosulfate. Soit n' le nombre de centimètres cubes de thiosulfate employés, 30 — n' (ou plus généralement n — n') représentent le thiosulfate correspondant au brome combiné et, par suite, au phénol de la prise d'essai. Comme une molécule de thiosulfate équivaut à 1/6 de molécule de phénol, le calcul est le suivant :

$$\text{Phénol de la prise d'essai} = (n - n') \frac{0{,}0094}{6} = (n - n')\ 0{,}00156.$$

On tiendra compte de ce résultat pour la préparation exacte de la solution mère.

b) *Argent :* Nous avons toujours employé les métaux sous forme

de sulfates et cela aussi bien pour le Cu et le Mn que pour Ag.

La préparation de ce dernier s'est effectuée de la façon et d'après la formule suivantes :

$$2\ No3Ag + So4H2 = So4Ag2 + 2No3H$$
$$2 \times 169{,}888 \quad 98 \quad 311{,}82$$

Dissoudre 10 grs de No3Ag dans un volume approximatif de 6 cc. d'eau. Chauffer aux environs de l'ébullition. Verser So4H2 un peu dilué et bien chaud (environ 15 cc. de So4H2). Laisser refroidir spontanément en portant au frigidaire. Puis, laver rapidement à l'eau glacée, pour éviter la dissolution des cristaux dans les eaux de lavage. Sécher à l'abri de la lumière. La solubilité de So4Ag2 est, à 15°, de :

$$2{,}57 \cdot 10^{-2} \text{ mol. litre}$$

soit environ une solubilité de 6 grs p. mille.

2° *Préparation des solutions mères :*

a) *des substances antiseptiques :* A partir des substances antiseptiques ainsi obtenues à l'état pur, nous avons préparé les solutions mères, en tenant compte de la solubilité respective de chaque produit, et en utilisant, comme solvant, l'eau distillée stérile. Voici, à titre d'exemple, les caractéristiques des 3 solutions mères du phénol, du thymolsulfonate et du carvacrolsulfonate de sodium :

	PHENOL	TH-Na	CA-Na
Quantités d'antiseptique en grs %, dans les solutions mères :	5 p. 100	20 p. 100	20 p. 100
Quantités d'antiseptique présentes dans un cm3 des solutions mères :	0 gr. 05	0 gr. 20	0 gr. 20
Nombre de gouttes correspondant à 1 cm3 des solutions mères :	XXXII gouttes	XXXI gouttes	XXXI gouttes
Quantités d'antiseptique présentes dans une goutte des solutions mères :	0 gr. 00156	0 gr. 0064	0 gr. 0064
Quantités d'antiseptique en grs par litre, obtenues en incorporant une goutte des solutions mères aux 5 cc. d'eau peptonée de chaque tube :	0 gr. 312	1 gr. 28	1 gr. 28

b) *des solutions des métaux :* Nous avons consacré une partie de nos recherches à l'étude de l'action catalytique que pourraient exercer certains ions métalliques sur le pouvoir bactéricide et bactériostatique de certaines substances elles-mêmes peu actives, lorsqu'on les associe à ces dernières, à des doses infinitésimales. Nous avons fait appel, pour cela, à trois ions métalliques : Cu++, Mn++ et Ag+. Nous avons essayé d'obtenir, pour chaque métal, une solution mère présentant une concentration de 0 gr. 010 par litre. En tenant compte des P.M. des sulfates utilisés et des masses atomiques des métaux correspondants, dont les valeurs respectives sont précisées dans le tableau suivant, nous devions, pour atteindre ce but, incorporer par litre les quantités suivantes :

28 grs 90 de So4Ag2
39 grs 20 de So4Cu, 5OH^2 et
40 grs 70 de So4Mn, 4OH^2

De telles solutions sont faciles à préparer avec le So4Cu et le So4Mn. Pour le So4Ag2, dont la solubilité est faible (environ 6 p. mille), nous avons dû préparer une solution dix fois plus diluée, contenant donc : 2 grs 89 par litre, soit 0 gr. 001 de Ag+ par centimètre cube.

Le tableau qui suit précise les caractéristiques des solutions mères de sulfates métalliques utilisées :

	ARGENT	CUIVRE	MANGANESE
Sels employés pour préparer les solutions mères :	So4Ag2	So4Cu,5OH^2	So4Mn,4OH^2
P. M. de ces sulfates :	311 gr. 820	249 gr. 710	223 gr. 054
Masses atomiques des métaux correspondants :	107 gr. 88	63 gr. 57	54 gr. 93
Quantités de sulfates métalliques en grs par litre dans les solutions mères :	2 gr. 89	39 gr. 20	40 gr. 70
Quantités de métal présentes dans un cm3 des solutions mères :	1 cm3 = 31 gouttes = 0 gr. 001 de Ag+	1 cm3 = 23 gouttes = 0 gr. 010 de Cu++	1 cm3 = 25 gouttes = 0 gr. 010 de Mn++
Quantités de métal présentes dans 1 goutte des solutions mères :	0 gr. 0000322	0 gr. 00043	0 gr. 0004
Quantités de métal en grs par litre, obtenues en incorporant une goutte des solutions mères aux 5 cc. de chaque tube :	0 gr. 00644	0 gr. 0868	0 gr. 0800

Toutes ces solutions ont été stérilisées à l'autoclave, à l'exception toutefois de la solution de So4Ag2.

Nota. — Il était important de préciser les valeurs des pH de ces solutions mères. Nous avons effectué ces mesures après une heure de contact. Voici les pH intéressant, d'une part l'eau peptonée et d'autre part, les solutions mères envisagées, soit isolément, soit après incorporation des ions métalliques aux concentrations choisies :

		VALEURS DES PH			
		seul	après addition de		
			Ag+	Cu++	Mn++
Eau peptonée	seule	7,3			
»	+ phénol (sol. à 5 c%)	7,2	7,3	7,2	7,3
»	+ TH-Na (sol. à 20 c%)	8,3	8,2	7,8	8,2
»	+ CA-Na (sol. à 20 c%)	7,4	7,3	7,2	7,3

3°) *Préparation des dilutions finales nécessaires pour chaque expérience.* — Ces dilutions se préparent extemporanément à partir des solutions mères et de la solution tampon, dont nous allons voir, à présent, la composition.

a) *Solution tampon :* On prépare deux solutions titrées :

— une solution de phosphate disodique, d'après la formule suivante :

Po4Na2H. 12oH2 (com. pur. R.P.) .. .. .. 23 grs 740
Eau distillée, q.s.p. .. .. 1.000 cc.

Cette solution a un pH de : 9,24

— une solution de phosphate monopotassique, de composition suivante :

Po4KH2 (R.P.) .. .. 9 grs 075
Eau distillée, q.s.p. .. .. 1.000 cc.

le pH de cette solution = 4,55

Par mélange de proportions différentes de chacune de ces deux solutions, on peut obtenir des liquides présentant toute une gamme de pH. Ainsi, pour le pH choisi (7,35), on prend :

710 cc. 10 de la solution phosphate disodique, et
189 cc. 90 de la solution de phosphate monopotassique.

Ces deux quantités sont mélangées dans un erlenmayer et on agite. Puis, on vérifie le pH : à cet effet, nous avons utilisé la méthode colorimétrique appliquée dans le Péhamètre Hellige à coin coloré 3.700. La mise au point de cet appareil se fait par tâtonnements, en ajoutant de la solution disodique si on est en milieu trop acide, et de la solution monopotassique si la réaction est trop alcaline. Une fois le pH obtenu, on stérilise.

b) *Préparation des dilutions finales :* Cette solution tampon va nous permettre d'obtenir extemporanément chacune des dilutions désirées. Voici, à titre d'exemple, quelques proportions utilisées :

Dilution désirée	Sol. tampon	Sol. de TH-Na à 20 %
20	3 cc. 75	1 cc. 25
30	4 cc. 17	0 cc. 83
40	4 cc. 38	0 cc. 62
50	4 cc. 50	0 cc. 50
60	4 cc. 59	0 cc. 41

Nota. — L'utilisation de la solution tampon, présentant un pH défini, permet d'effectuer toutes les expériences dans des conditions sensiblement identiques et très favorables pour le développement des micro-organismes pris comme témoins.

C. — Préparation des suspensions microbiennes :

D'une façon générale, nous avons fait appel à des microbes pathogènes courants et de morphologie différente (Gram positif et Gram négatif). Nous avons ainsi choisi dans la classification systématique des bactéries, en étant guidé par le double souci de faire appel à des germes dont les souches à caractères fixés puissent être obtenues facilement, et intéressant, par leurs diverses localisations dans l'organisme, plusieurs portes d'entrée. Ainsi, avons-nous utilisé : le Staphylocoque doré, le Colibacille, le bacille d'Eberth, le Proteus vulgaris, etc... Tous ces germes ont été cultivés sur des milieux convenables.

Le Staphylocoque doré a été conservé en utilisant la pomme de terre comme souche. Nous avons constaté qu'il était ainsi mieux pigmenté. On prend une grosse pomme de terre, on la lave à grande eau, puis on la coupe en petits morceaux, que l'on trempe dans une solution de soude à 2 p. mille. Après un contact de 5 à 6 heures, on introduit un de ces morceaux dans un tube à étranglement et on stérilise une heure à 120°. On ensemence et on met à l'étuve à 37°.

Le Colibacille a été conservé sur gélose ordinaire et le bacille de Loeffler sur sérum coagulé. Chaque souche a subi, à intervalles réguliers, les repiquages qui s'imposaient.

A partir de ces souches, nous avons préparé chaque jour nos émulsions microbiennes. Nous n'avons commencé notre expérimentation que sur les germes obtenus après un huitième repiquage à partir de cultures de 24 heures. Il importait d'adapter les souches au milieu avant de procéder aux actions toxiques. Pour les trois microbes précités, nous avons employé des cultures sur bouillon. La préparation du bouillon à partir de la souche microbienne se fait avec toutes les

précautions bactériologiques d'usage : on prélève les germes avec l'anse de platine sur la surface de la gélose, en évitant de gratter celle-ci ; on prend le tube de bouillon stérile et on émulsionne sur la paroi interne dans une goutte de liquide. On agite par mouvement circulaire.

D. — Matériel d'expérience :

Tout le matériel utilisé pour nos expériences était stérile, y compris les pipettes graduées employées pour les dilutions.

La même pipette Pasteur, préalablement stérilisée et respectivement affectée à un germe, était employée pour chaque série d'essais ; en outre, les expériences bactéricides et les manipulations bactériostatiques utilisaient chacune une pipette propre.

De même, nous avons affecté à chaque métal une pipette, dont nous avons, au préalable, mesuré le calibre en précisant pour chacune le nombre de gouttes au gramme. Ainsi, nous étions sûr d'incorporer dans chacune de nos expériences la même quantité de métal.

Après chaque série d'essais, les pipettes étaient lavées au mélange sulfo-chromique, à l'eau stérile et à l'alcool, puis flambées.

Nota. — Les tubes de subculture étaient tous constitués par du bouillon ordinaire, dont nous avons déjà précisé antérieurement la composition.

E. — Techniques utilisées pour nos essais

1° *Procédé de mesure du pouvoir bactéricide.*

a) On prépare, comme il a été dit plus haut, d'une part, la solution de la substance antiseptique, et, d'autre part, la suspension microbienne ;

b) On dispose une série de tubes stériles ; généralement, nous en avons pris neuf, dont un sert de témoin. Dans chacun d'eux, on introduit un volume uniforme de 5 centimètres cubes de chacune des dilutions du produit étudié, dilutions convenant aux conditions de l'essai. Ces dilutions se font extemporanément, par mélange des solutions mères d'antiseptique et de la solution tampon. Dans chaque série simplement, un des tubes ne recevra ni désinfectant ni métal : il servira de témoin. Si on a du métal à ajouter, on l'incorpore, à ce moment-là, en utilisant pour tous les essais la même pipette et pour chaque métal une pipette spéciale. On assure l'homogénéité du mélange par rotation circulaire des tubes entre les mains.

c) *Ensemencement :* On ajoute alors, dans chacun des tubes ainsi disposés, V gouttes d'une culture de 24 heures à 37° du germe considéré. Les ensemencements de chaque série de tubes se font toujours

avec la même pipette et dans les mêmes conditions, afin d'incorporer un nombre sensiblement identique de microbes. On laisse un intervalle d'une demi-minute entre les additions de culture microbienne dans chaque tube ; de telle sorte que si, par exemple, pour une série de neuf tubes, nous voulons effectuer trois séries d'expériences, correspondant respectivement à des temps de contact de 5, 10 et 15 minutes, nous pourrons, à condition d'être deux, opérer selon le rythme suivant. (En opérant seul, les intervalles doivent être sensiblement augmentés.)

On commence de chronométrer après le premier ensemencement ; toutes les 30 secondes, on laisse tomber V gouttes de la culture microbienne dans chacun des neuf tubes de la série, en respectant scrupuleusement cet intervalle de temps. On a, par exemple :

	1er tube	2e tube	3e tube	4e tube	5e tube	6e tube	7e tube	8e tube	9e tube
Temps :	0	30"	1'	1'30"	2'	2'30"	3'	3'30"	4'

Chaque tube est, après chaque nouvelle addition, agité par rotation, pour homogénéiser le mélange. Le tube témoin peut être ensemencé par la suite. La série des neuf tubes demande donc un laps de temps de 4 minutes, ce qui donne un battement de 1 minute, puisque nous devrons procéder au premier repiquage au bout de 5 minutes.

d) Report dans les subcultures : Les repiquages se succèdent au même rythme de 30 secondes entre chaque tube ; et ainsi chaque tube est repiqué dans la subculture correspondante, exactement 5 minutes après avoir été ensemencé. Après le repiquage du dernier tube, on est en mesure de faire de nouveaux reports dans d'autres subcultures et ainsi, on peut obtenir une nouvelle série, dont les résultats correspondront à un contact, entre l'antiseptique et le microbe, de 10 minutes. Cette série terminée, on commencera celle des 15 minutes, en partant toujours des tubes contenant le mélange initial, formé de la solution d'antiseptique et de la suspension microbienne.

Les repiquages se font avec l'anse de platine. Les essais ont lieu à une température de 15° à 18°.

e) Puis, les tubes de subcultures sont capuchonnés et portés à l'étuve à 37°-C.

f) La lecture des résultats se fait après un séjour à l'étuve de 24, 48 ou 72 heures ; on vérifie par des colorations de Gram. Nous avons, en effet, constaté que les tubes de subcultures devaient rester plusieurs jours à l'étuve : les résultats peuvent différer, selon que la lecture se fait au bout de 24, 48 ou 72 heures. Aussi, avons-nous toujours attendu 72 heures, avant de considérer nos lectures comme définitives. Chacune de nos expériences a été systématiquement reproduite plusieurs fois.

Le tableau suivant, que nous pourrions doubler de bien d'autres, illustre les faits que nous venons de préciser ; il intéresse la détermination du pouvoir bactéricide du phénol associé à Ag+, avec le Staphylocoque doré comme organisme témoin. Nous constatons que la concentration au 1/260, pour un contact de 10 minutes, n'est devenue légèrement positive qu'au bout de 72 heures.

Phénol (conc.)	Après 24 heures			Après 48 heures			Après 72 heures		
	temps de contact			temps de contact			temps de contact		
	5'	10'	15'	5'	10'	15'	5'	10'	15'
1/240	—	—	—	+	—	—	+	—	—
1/260	+	—	—	+	—	—	+	±	—
1/280	+	+	—	+	+	—	+	+	±

Le dispositif d'une série d'essais, intéressant par exemple le phénol, associé à Ag, après un contact de 10 minutes entre ce mélange antiseptique et le Staphylocoque doré, pris comme organisme témoin, peut être schématisé de la façon suivante :

TUBES	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4	N° 5	N° 6	N° 7	N° 8	N° 9
Phénol à 5 % (en cent. cubes)	0.713	0.625	0.55	0.45	0.41	0.38	0.36	0.33	0
Sol. tampon : (en cent. cubes)	4.287	4.375	4.45	4.55	4.59	4.62	4.64	4.67	5
Concentration.	1/140	1/160	1/180	1/220	1/240	1/260	1/280	1/300	T
Subcultures correspondantes :	—	—	—	—	—	±	+	+	+

Conclusion. — D'après l'expérience ci-dessus, on peut formuler la conclusion suivante :

« Associé à Ag+, et en présence de Staphylocoque doré comme organisme témoin, la plus faible concentration de phénol capable de dévitaliser les germes en 10 minutes est ici de 1/240e. »

2° *Procédé de mesure du pouvoir bactériostatique.*

a) Préparer, comme il a été dit, d'une part, la solution de la substance antiseptique, et, d'autre part, la suspension microbienne ;

b) Faire des essais préliminaires en utilisant des concentrations assez éloignées les unes des autres, pour localiser approximativement la zone d'activité.

On dispose une série de tubes (généralement 6), contenant chacun la même quantité d'eau peptonée, soit 5 cc. On introduit dans ces derniers des quantités croissantes de la solution d'antiseptique envisagé. Nous avons généralement incorporé de 1 à 6 gouttes, en faisant appel aux solutions mères déjà utilisées pour la détermination du pouvoir bactéricide, soit : pour le phénol, une solution à 5 % : pour le thymolsulfonate et le carvacrolsulfonate de sodium, des solutions à 20 %. Après avoir précisé le nombre de gouttes que chacune de ces solutions donnait au gramme, nous connaissions la quantité d'antiseptique incorporée par goutte. Ainsi, nous avions :

	Phénol à 5 %	TH-Na à 20 %	CA-Na à 20 %
Concentration en antiseptique par cm3 (en grammes) :	0 gr. 05	0 gr. 20	0 gr. 20
N° de gouttes par cm3 :	XXXII gttes	XXXI gttes	XXXI gttes
Concentration en antiseptique par goutte (en gramme) :	0 gr. 00156	0 gr. 0064	0 gr. 0064

Pour chaque série, on met un tube témoin, dépourvu d'antiseptique : il permet de constater le développement normal des germes et l'efficacité de l'ensemencement. S'il y a lieu, on ajoute alors le métal en utilisant les solutions mères déjà employées pour la détermination du pouvoir bactéricide. Mélanger par rotation, pour bien homogénéiser.

c) Ensemencer chaque tube à l'anse de platine, en prélevant le micro-organisme témoin sur une culture en bouillon de 24 heures ;

d) Capuchonner les tubes et les mettre à l'étuve à 37°.

e) Faire la lecture des résultats au bout de 24, 48 et 72 heures, en précisant la concentration la plus faible pour laquelle la culture n'a pas lieu. Comme criterium de ce résultat, on examine soigneusement le milieu, qui doit rester parfaitement limpide, même après agitation énergique du tube, afin de remettre éventuellement en suspension les germes qui auraient pu se déposer. Souvent, nous avons, en outre, introduit un indicateur de pH coloré pour vérifier qu'il n'y a pas eu acidification.

TROISIEME PARTIE

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Nous devons, à présent, établir le bilan de nos recherches expérimentales. Cet exposé sera scindé en deux sections :

A. — Dans une première section, nous exposerons les résultats auxquels nous sommes parvenus, en étudiant le pouvoir bactéricide de quelques dérivés du phénol, du thymol et du carvacrol.

Après avoir constaté la faiblesse de l'activité antimicrobienne de ces produits, nous tenterons d'en établir une classification bactériologique, en adoptant des temps de contact relativement longs entre les antiseptiques et les micro-organismes pris comme témoins.

B. — Dans une deuxième section, nous essaierons de mettre en relief une notion intéressante, qui est la conclusion de notre travail : elle concerne le renforcement du pouvoir antiseptique du phénol, du thymolsulfonate et du carvacrolsulfonate de sodium, par l'intervention, à doses infinitésimales, de certains ions métalliques et notamment de Ag^+.

Voici le plan de cette troisième partie :

PLAN DE LA TROISIÈME PARTIE

Résultats expérimentaux

1re section : POUVOIR ANTISEPTIQUE DE CERTAINS DERIVES SULFONES DU PHENOL, DU THYMOL ET DU CARVACROL

2e section : RENFORCEMENT DU POUVOIR ANTISEPTIQUE DU PHENOL, DU THYMOLSULFONATE ET DU CARVACROLSULFONATE DE SODIUM, PAR LES SELS METALLIQUES

SOMMAIRE

§ I. — Renforcement du pouvoir bactéricide :

Chap. I. — POUVOIR BACTERICIDE PROPRE DES SUBSTANCES ENVISAGEES :
- Phénol,
- Thymolsulfonate et carvocrolsulfonate de sodium.

Chap. II. — POUVOIR BACTERICIDE PROPRE DES SELS METALLIQUES.

Chap. III. — POUVOIR BACTERICIDE DES SUBSTANCES ENVISAGEES, ASSOCIEES AUX METAUX :
- I. — Action de Cu++.
- II. — Action de Mn++.
- III. — Action de Ag+.

Conclusions.

§ II. — Renforcement du pouvoir bactériostatique :

Chap. I. — POUVOIR BACTERIOSTATIQUE PROPRE DES SUBSTANCES ENVISAGEES (phénol, thymolsulfonate et carvacrolsulfonate de sodium).

Chap. II. — POUVOIR BACTERIOSTATIQUE PROPRE DES SELS METALLIQUES.

Chap. III. — POUVOIR BACTERIOSTATIQUE DES SUBSTANCES ENVISAGEES, ASSOCIEES AUX METAUX :
- I. — Action de Cu++.
- II. — Action de Mn++.
- III. — Action de Ag+.

Conclusions.

CONCLUSIONS GENERALES

PREMIERE SECTION

POUVOIR ANTISEPTIQUE DE CERTAINS DÉRIVÉS SULFONÉS DU PHÉNOL, DU THYMOL ET DU CARVACROL

Nous allons, pour cet exposé, reprendre l'ordre que nous avons suivi au cours de nos recherches expérimentales.

Voici, tout d'abord, en regard de chaque produit étudié, d'une part, la nature de la concentration des solutions mères utilisées, et, d'autre part, les abréviations respectives dont nous nous sommes servis pour l'exposé de nos résultats.

Substances chimiques étudiées	Concentrations des solutions utilisées	Abréviations correspondantes
— thiocol	20 %	
— thymolsulfonate de sodium	20 %	TH-Na
— thymolsulfonate de potassium	20 %	TH-K
— thymolsulfonate d'ammonium	20 %	TH-NH4
— thymolsulfonate de calcium	10 %	TH-Ca
— carvacrolsulfonate de sodium	20 %	CA-Na
— phénolsulfonate de sodium (ortho et para)	15 %	PH-Na

On doit noter les fortes concentrations de ces solutions mères, dont certaines correspondent au coefficient maximum de solubilité du produit étudié, et que nous avons dû adopter, en raison du faible pouvoir bactéricide que ces différentes substances ont manifesté dès nos premiers essais.

Envisageons, tout d'abord, l'étude du thymolsulfonate et du carvacrolsulfonate de sodium.

En opérant, soit en présence de Colibacille, soit avec le Staphylocoque doré, à des concentrations relativement faibles, variant du 1/20 au 1/50, et pour des temps de contact de 5, 10 et 15 minutes, tous les essais effectués dans de telles conditions expérimentales ont été concordants : tous nos milieux ont poussé. Ce résultat est la signature du faible pouvoir microbicide de ces substances et nous permet de tirer la conclusion suivante :

« Ni le TH-Na, ni le CA-Na ne sont bactéricides pour le Coli-

bacille et le Staphylocoque doré, même en opérant avec une concentration du 1/20 et un temps de contact de 15 minutes. »

Ces résultats nous ont amené à poursuivre l'étude de ces substances, après avoir considérablement modifié les conditions expérimentales de nos essais. Nous avons opéré avec des concentrations plus fortes et des temps de contact bien plus prolongés entre l'antiseptique et l'organisme témoin. Pour ces derniers, nous avons retenu les temps de une heure et trois heures.

Bien entendu, dès lors qu'une substance exige de telles conditions d'essai pour manifester une activité antibiotique, on peut conclure qu'elle est pratiquement sans valeur thérapeutique. Cette restriction importante une fois posée, ce *modus operandi* nous a permis tout de même d'établir entre les corps précités une certaine hiérarchie bactériologique qui, comme nous allons le voir, n'est pas dépourvue d'intérêt.

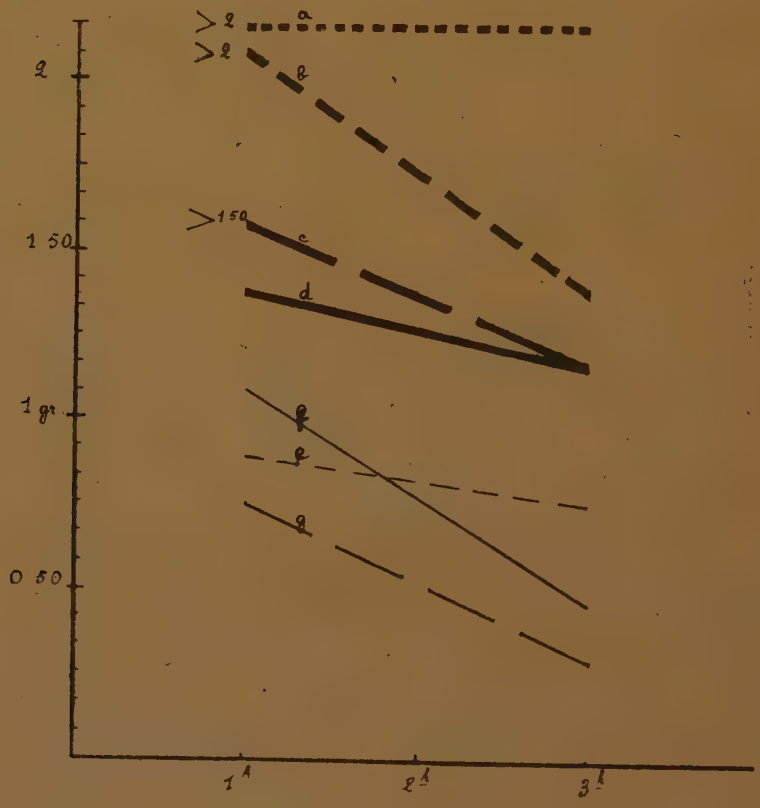
Le tableau qui va suivre résume nos résultats vis-à-vis du Colibacille, du bacille d'Eberth et du Staphylocoque doré. Les doses indiquées correspondent à la quantité d'antiseptique contenue dans les 10 centimètres cubes de notre prise d'essai, qui a été juste nécessaire pour obtenir, dans les conditions expérimentales précisées, l'effet bactéricide.

Nota. — Certains corps n'ont même pas été capables d'aboutir à cette action antibiotique avec la concentration maxima qui était compatible avec leur coefficient de solubilité. Nous avons exprimé ce fait en plaçant devant les doses ainsi limitées le signe >. Exemple : Le CA-Na, mis en présence de Colibacille, pendant une durée de 1 heure, à la concentration de 2 gr. pour 10 cc. — soit au 1/5 — n'a pas empêché la subculture de pousser ; nous notons ce résultat par le chiffre 2 précédé du signe > — soit > 2 — porté dans la première case du tableau suivant, sur lequel nous avons condensé tous les résultats intéressant les substances de cette première section.

Substances chimiques envisagées	COLIBACILLE		BACILLE D'EBERTH			Staphylocoque
	Durée du contact entre l'antiseptique et le germe		Durée du contact entre l'antiseptique et le germe			Durée du contact entre l'antiseptique et le germe
	1 heure	3 heures	1 heure	3 heures	24 heures	1 heure
CA-Na	> 2	1.40	> 2	1.20	0.30	> 2
PH-Na (ortho)	0.75	0.34	0.41	0.23	0.05	1.05
PH-Na (para)	> 1.50	1.15	0.75	0.70	0.23	> 1.50
Thiocol	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2	> 2
TH-Na	> 2	1.40	1.40	1.15	0.60	> 2
TH-K	1.45	1.15	1.40	1.10	0.70	> 2
TH-NH4	0.90	0.75	0.50	0.30	0.20	> 2
TH-Ca	> 1	0.47	0.90	0.70	0.30	> 1

Portons sur un graphique les valeurs ci-dessus qui intéressent le Colibacille. Sur l'axe des abscisses, mentionnons les temps d'action des substances envisagées, et sur l'axe des ordonnées, les valeurs qui traduisent leur pouvoir antibiotique. Nous obtenons la série de courbes suivantes, dont l'ensemble représente l'activité relative de chaque substance par rapport à celle des autres corps expérimentés.

Pouvoir antibiotique des dérivés sulfonés du phénol, du thymol et du carvacrol, déterminé vis-à-vis du COLIBACILLE :



a = thiocol
b = CA-Na
c = PH-Na (para)
d = TH-K
e = TH-NH^4
f = TH-Ca
g = PH-Na (ortho)

Conclusions

De l'étude des substances envisagées dans cette première section, on peut tirer les conclusions suivantes :

1° Tous les corps étudiés ont un faible pouvoir antibiotique :

2° Voici quel est l'ordre de classement des produits envisagés, d'après leur pouvoir bactéricide propre, en allant du plus antiseptique au moins actif :

a) Vis-à-vis du Colibacille :

PH-Na (ortho)
TH-NH^4
TH-Ca
TH-K
PH-Na (para)
TH-Na et
CA-Na
.....
Thiocol

b) Vis-à-vis du bacille d'Eberth :

PH-Na (ortho)
TH-NH^4
TH-Ca et
TH-Na (para)
TH-K
TH-Na
CA-Na
.....
Thiocol

c) Vis-à-vis du Staphylocoque doré :

Seul de tous ces corps, le PH-Na (ortho) a manifesté une activité à l'endroit de ce germe.

3° Il faut noter le très faible pouvoir bactéricide du thiocol, qui, même à une grande concentration et avec un temps de contact de 24 heures, s'est révélé inactif vis-à-vis du Colibacille, du bacille d'Eberth et du Staphylocoque doré.

4° Le PH-Na (ortho) est doué de propriétés antiseptiques plus marquées que le PH-Na (para), et cela aussi bien en présence de Colibacille et du bacille d'Eberth que du Staphylocoque doré.

5° Le TH-Ca est plus actif que le TH-Na (influence du Ca).

6° Les différents micro-organismes éprouvés ne présentent pas tous le même pouvoir de résistance aux substances envisagées. Si nous les classons d'après leur sensibilité décroissante (le premier étant celui qui résiste le moins et le dernier celui qui résiste le plus), nous obtenons l'ordre suivant :

— Colibacille,
— Bacille d'Eberth,
— Staphylocoque doré,
— Bac subtilis.

DEUXIEME SECTION

RENFORCEMENT DU POUVOIR ANTISEPTIQUE DU PHÉNOL, DU THYMOLSULFONATE DE SODIUM ET DU CARVACROLSULFONATE DE SODIUM PAR LES SELS MÉTALLIQUES

Sommaire

Devant la faiblesse du pouvoir antibiotique des corps expérimentés, il nous a paru intéressant de voir s'il ne serait pas possible d'accroître leur activité antimicrobienne par l'intervention, même à faibles doses, de certains sels métalliques.

L'influence des ions métalliques sera probante si les conditions expérimentales sont choisies de façon telle que l'on ne puisse rapporter au métal *seul* les résultats observés. Pour atteindre ce but, la marche à suivre comportera donc trois temps :

1° La détermination du propre pouvoir antimicrobien de la substance antiseptique envisagée (pouvoir bactéricide ou pouvoir bactériostatique) ;

2° La fixation de la propre activité antibactérienne des sels métalliques incorporés (activité bactéricide ou bactériostatique) ;

3° Enfin, l'établissement du nouveau pouvoir bactéricide ou bactériostatique accusé par le mélange, substance antiseptique plus sel de métal.

Ces trois séries d'épreuves doivent être effectuées dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques, afin d'obtenir des résultats parallèles et susceptibles de comparaison. Plusieurs séries d'essais seront réalisées pour chaque cas et le résultat définitivement admis sera celui qui accusera une constante régularité et qui n'aura jamais été soit contredit, soit démenti au cours des différents essais.

Nous avons limité notre champ d'expériences aux trois substances chimiques suivantes :

— Phénol,
— Thymolsulfonate de sodium,
— Carvacrolsulfonate de sodium.

Pour chacune d'elles, nous avons étudié successivement : l'action bactéricide et l'action bactériostatique. C'est dans le cadre de chacune de ces deux actions que nous avons essayé de préciser le pouvoir de renforcement exercé par l'intervention de certains ions métalliques.

Voici donc notre plan général :

Paragraphe premier. — Renforcement du pouvoir *bactéricide* du phénol, du thymolsulfonate et du carvacrolsulfonate de sodium par certains sels métalliques.

Paragraphe deuxième. — Renforcement du pouvoir *bactériostatique* de ces mêmes substances par les mêmes sels de métaux.

PARAGRAPHE PREMIER

RENFORCEMENT DU POUVOIR BACTÉRICIDE

Pour déterminer ce pouvoir bactéricide, nous avons, dans chaque cas, employé le protocole d'expérimentation choisi. Comme microorganismes, nous avons à dessein pris un germe Gram négatif et un germe Gram positif, soit le Colibacille et le Staphylocoque doré.

Deux notions restent à présent à préciser : le choix des dilutions de la substance antiseptique et la durée des temps de contact finalement adoptée.

De multiples essais préliminaires ont été nécessaires avant de pouvoir délimiter la zone d'influence de chaque substance antiseptique, et cela pour chaque microbe pris successivement comme témoin. Petit à petit, nous avons pu ainsi atteindre la zone limite d'action correspondant donc à la dose antibiotique du sel expérimenté. Nous ne l'avons définitivement admise qu'après plusieurs contrôles.

Comme temps de contact entre l'antiseptique et le germe, nous nous sommes arrêtés aux trois suivants : 5 minutes, 10 minutes et 15 minutes ; nous avons délaissé les durées excessives qui, comme nous l'avons déjà dit, donnent des résultats d'un intérêt douteux et d'une interprétation délicate.

Pour limiter nos termes de comparaison, nous ne mentionnerons, dans nos conclusions, que les résultats se rapportant au temps de contact de 10 minutes ; le rapprochement de l'activité des différentes substances y gagnera nécessairement en clarté. De plus, tous nos résultats seront transcrits sous forme de tableaux, à moins que l'homogénéité des conclusions intéressant plusieurs produits ne nous en dispense. Chaque tableau ne mentionnera, pour chaque substance antiseptique, que les dilutions voisines de celle qui, dans nos essais, s'est avérée correspondre à la véritable dose antibiotique. Il va de soi que chaque tableau est un résumé synthétique de toute une série d'épreuves dont il représente fidèlement les résultats, qui se sont avérés toujours réguliers et constants.

Suivant notre plan, nous allons, à présent, envisager successivement les trois séries d'épreuves dont nous avons déjà souligné la nécessité et l'importance.

CHAPITRE PREMIER

POUVOIR BACTERICIDE PROPRE des SUBSTANCES ENVISAGEES
(phénol-thymolsulfonate et carvacrolsulfonate de sodium)

I. — *Phénol :*

Les résultats intéressant ce corps sont tous condensés dans le tableau suivant :

PHENOL (concentration)	Temps de contact entre le *phénol* et le *Colibacille*			Temps de contact entre le *phénol* et le *Staphylocoque doré*		
	5'	10'	15'	5'	10'	15'
1/80	—	—	—	—	—	—
1/100	—	—	—	—	—	—
1/110	—	—	—	...+	—	—
1/120	...+	—	—	+	+	±
1/130	+	±	±	+	+	+
1/140	+	+	±	+	+	+
1/150	+	+	+	+	+	+

Conclusion : « Pour un temps de contact de 10 minutes entre l'antiseptique et le germe, la dilution la plus forte de phénol pour laquelle nous n'avons jamais eu de culture positive, correspond au 1/120, en présence de Colibacille et au 1/110 vis-à-vis du Staphylocoque doré.

« La valeur respective de chacune de ces dilutions traduit donc la dose bactéricide du phénol vis-à-vis de chacun des deux germes considérés. »

Avec le Staphylocoque doré, le phénol s'est montré un peu moins actif qu'avec le Colibacille. Cette constatation vient corroborer la remarque que nous avons déjà faite précédemment au sujet de la sensibilité inégale qu'accusent les germes microbiens à l'action des substances antiseptiques.

Les résultats intéressant le Staphylocoque ont été obtenus sur bouillon non glucosé, la souche utilisée provenant d'une culture sur bouillon glucosé.

II. — *Thymolsulfonate et carvacrolsulfonate de sodium :*

Ces deux sels, comme nous l'avons déjà vu, ont un très faible pouvoir bactéricide. Leur action a été nulle, aussi bien en présence de Colibacille que de Staphylocoque doré, même en opérant avec une concentration du 1/20 et un temps de contact de 15 minutes.

CHAPITRE DEUXIEME

POUVOIR BACTERICIDE PROPRE DES SELS METALLIQUES

Après avoir établi le pouvoir bactéricide des trois substances chimiques qui font l'objet de notre étude, nous devons faire la preuve que les sels des métaux qui seront par la suite incorporés à ces substances n'ont pas, aux concentrations utilisées, un pouvoir microbicide propre ; dans ce cas-là, en effet, on pourrait, par erreur, attribuer à leur intervention une exaltation éventuelle du pouvoir bactéricide de nos substances, qui, en réalité, serait le résultat d'une superposition de deux valeurs antiseptiques. Nous devons donc faire, avec ces sels de métaux, des essais absolument superposables à ceux que nous ferons par la suite. Pour plus de sûreté, nous étendrons même notre champ d'expériences, en utilisant des doses de métal six fois supérieures à celles que nous incorporerons à nos antiseptiques.

A. — Précisons, tout d'abord, sous quelle forme et à quelle concentration nous utiliserons ces métaux.

Comme nous l'avons déjà indiqué dans notre deuxième partie (page 39), les trois métaux essayés (Cu, Mn et Ag) sont d'abord obtenus sous forme de sulfates, dont la pureté est contrôlée. Les sulfates de ces trois métaux donnent des solutions plus stables que ceux du Fe, du Co et de la plupart des sulfates de métaux lourds, qui subissent dans l'eau une hydrolyse très importante. C'est d'ailleurs une des raisons pour lesquelles nous avons choisi ces trois métaux. On prépare ensuite les solutions mères, par dissolution dans un litre d'eau distillée de la fraction de molécule-gramme du sulfate métallique correspondant. A chaque solution, on attribue un compte-gouttes, dont on détermine, au préalable, le nombre de gouttes fournies au gramme. Ceci nous permet de fixer la quantité d'ion métallique incorporée par goutte.

Nous avons résumé, dans le tableau suivant, tout d'abord, la fraction de molécule-gramme des sulfates incorporés par litre pour l'obtention des solutions mères ; puis, la quantité de métal présente dans un centimètre cube et une goutte des solutions mères ; enfin, la quantité de métal, en grammes par litre, obtenue en incorporant aux 5 centimètres cubes de chaque tube de bouillon la dose uniforme de une goutte de la solution mère du métal correspondant. Cette dernière concentration sera celle que nous retiendrons pour tous les essais intéressant le renforcement du pouvoir bactéricide.

Quantités de sulfates métalliques en grs par litre dans les solutions mères	Quantités de métal présentes dans 1 cm3 des solutions mères (en grammes)	Quantités de métal présentes dans 1 goutte des sol. mères (en grammes)	Quantités de métal en grs par litre obtenues en incorporant une goutte de la sol. mère aux 5 cc. de bouillon
So4Ag2 = 2 gr. 89	0.001 de Ag+	0.0000322 de Ag+	0.00644 de Ag+
So4Cu,50H2 = 39 gr. 20	0.010 de Cu++	0.00043 de Cu++	0.0868 de Cu++
So4Mn,40H2 = 40 gr. 70	0.010 de Mn++	0.0004 de Mn++	0.0800 de Mn++

Nous voyons que, dans chaque cas, les concentrations en ions métalliques sont très faibles.

B. — Ces métaux ont-ils un pouvoir bactéricide propre ?

Pour répondre à cette question, nous allons, avec chacun d'eux, faire les essais annoncés. Nous emploierons une technique uniforme et superposable à celle de toutes nos expériences :

A 5 centimètres cubes de solution tampon, nous ajoutons 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 gouttes de la solution mère de métal. Nous ensemençons et après un temps de contact de 5 minutes, 10 minutes et 15 minutes, nous reportons dans les subcultures correspondantes. La lecture des résultats se fait après une durée de 24, 48, 72 et même 96 heures, en cas de doute.

Les résultats sont homogènes pour les trois métaux et vis-à-vis des deux germes (Colibacille et Staphylocoque) envisagés : toutes les subcultures ont poussé, y compris celles qui correspondent aux tubes ayant reçu VI gouttes de solution mère, c'est-à-dire présentant une concentration respective en ions métalliques et par litre de :

0 gr. 03864 pour l'Argent,
0 gr. 5208 pour le Cuivre et
0 gr. 4800 pour le Manganèse.

Conclusion :

« Les métaux envisagés n'ont accusé aucune action bactéricide propre, dans les conditions expérimentales que nous avons appliquées. Les résultats ont été toujours négatifs, même avec une concentration en ions métalliques six fois supérieure à celle que nous adjoindrons à nos substances antiseptiques, au cours des essais que nous allons à présent envisager. »

CHAPITRE TROISIEME

POUVOIR BACTERICIDE DES SUBSTANCES ENVISAGEES (phénol-thymolsulfonate et carvacrolsulfonate de sodium) ASSOCIEES AUX METAUX

Après avoir déterminé le pouvoir bactéricide propre de nos trois substances et prouvé que les métaux sont dépourvus d'action microbicide aux doses qui seront incorporées, il reste à préciser ce que devient le pouvoir bactéricide initial de chacune des trois substances après l'addition d'un métal. L'apparition d'une activité microbicide là où elle n'existait pas avant l'incorporation du métal, ou bien, et consécutivement à cette dernière, l'augmentation d'une activité antimicrobienne préexistante, témoigneront du pouvoir de renforcement des métaux incorporés.

Dans toutes les expériences intéressant ce chapitre, nous ajoutons à chaque tube, contenant déjà 5 cc. de la solution antiseptique, un volume uniforme de solution métallique, soit une goutte. Cette goutte, nous l'avons déjà vu, ne correspond pas à la même valeur pour chaque métal. Le tableau figurant à la page 39 précise justement cette valeur en ion métallique de chaque goutte incorporée et également la concentration finale (toujours en ion métallique) obtenue par litre.

Nous avons ainsi repris, une à une, chacune des expériences rapportées, en incorporant à chaque tube une goutte de la solution métallique envisagée.

Nos résultats seront classés par métal, en étudiant l'action de chacun d'eux sur chacune de nos trois substances.

I. — *ACTION DE Cu++*

Comme nous l'avons vu, l'action de ce métal sera étudiée à la concentration en Cu++ de :

0 gr. 0868 par litre,

par l'incorporation, aux 5 cc. de chaque tube, du volume uniforme de 1 goutte de la solution mère de So^4Cu.

Nous envisagerons successivement cette action vis-à-vis du Colibacille et du Staphylocoque doré. Voici nos résultats :

A — *Action du Cu++ sur le phénol :*

Phénol (conc.)	Conc. en Cu++ par litre (grs)	Phénol et Colibacille Temps de contact			Phénol et Staphylocoque doré Temps de contact		
		5'	10'	15'	5'	10'	15'
1/80	0.0868	—	—	—	—	—	—
1/90	id.	—	—	—	—	—	—
1/110	id.	—	—	—	+	—	—
1/120	id.	—	—	—	+	±	±
1/130	id.	+	—	—	+	±	±
1/160	id.	+	+	±	+	+	+
1/180	id.	+	+	+	+	+	+

Résultats :

1° Vis-à-vis du Colibacille, la dose antibiotique du phénol, en présence d'une concentration en Cu++ de 0 gr. 0868 par litre, correspond à la dilution du 1/130, pour un temps de contact de 10 minutes ; dans les mêmes conditions expérimentales, le phénol seul a accusé une dose correspondant à la dilution du 1/120. On peut donc conclure à une intervention positive du Cu++, mais cette intervention est extrêmement discrète.

2° Vis-à-vis du Staphylocoque doré, la dose limite, pour laquelle nous n'avons jamais eu de culture positive, en maintenant les conditions expérimentales ci-dessus précisées, est ici du 1/110. Ce résultat est exactement superposable à celui du phénol seul. Le Cu++ n'a donc aucune action de renforcement de l'activité microbicide du phénol vis-à-vis du Staphylocoque doré.

B. — *Action du Cu++ sur le thymolsulfonate et sur le carvacrolsulfonate de sodium :*

Nous avons essayé l'activité de ces deux substances, vis-à-vis du Colibacille et du Staphylocoque doré, aux concentrations du 1/20, 1/30 et 1/40, après avoir, en outre, comme pour le phénol, réalisé dans ces solutions, une concentration en ion Cu++ de 0 gr. 0868 par litre.

Toutes les cultures ont poussé, malgré la présence de Cu++. Ces résultats sont absolument superposables à ceux obtenus avec le TH-Na et le CA-Na employés seuls ; ils prouvent que le Cu++ n'accroît nullement, par sa présence, l'activité bactéricide de ces deux substances.

Conclusion : Condensons en un seul tableau les résultats concernant le pouvoir de renforcement de l'ion Cu++, présent à la concentration de 0 gr. 0868 par litre. Ces résultats sont valables pour un temps de contact de 10 minutes entre l'antiseptique et le germe.

Produit	DOSES ANTIBIOTIQUES vis-à-vis du Colibacille		DOSES ANTIBIOTIQUES vis-à-vis du Staphylocoque doré	
	Seul	Avec Cu++	Seul	Avec Cu++
Phénol	1/120	1/130	1/110	1/110
CA-Na	inactif	inactif	inactif	inactif
TH-Na	inactif	inactif	inactif	inactif

« Pour le Cu++, on enregistre une seule action de renforcement de pouvoir bactéricide : elle intéresse le phénol, agissant vis-à-vis du Colibacille et elle est, en outre, très discrète. »

II. — *ACTION DE Mn++*

L'action de l'ion Mn++ sera envisagée à la concentration en Mn++ de : *0 gr. 08 par litre*, en incorporant aux 5 cc. de chaque tube, 1 goutte de la solution mère de So^4Mn. Le Colibacille et le Staphylocoque doré seront encore pris, tour à tour, comme organismes témoins.

Voici nos résultats :

A. — *Action du Mn++ sur le phénol :*

Phénol (conc.)	Conc. en Mn++ par litre (grammes)	Phénol et Colibacille Temps de contact			Phénol et Staphylocoque doré Temps de contact		
		5'	10'	15'	5'	10'	15'
1/80	0.08	—	—	—	—	—	—
1/100	id.	—	—	—	+	—	—
1/110	id.	+	—	—	+	—	—
1/120	id.	+	—	—	+	+	±
1/130	id.	+	±	±	+	+	+
1/140	id.	+	+	±	+	+	+
1/150	id.	+	+	+	+	+	+

Résultats :

1° Vis-à-vis du Colibacille, et pour un temps de contact de 10 minutes, nous n'avons jamais eu de culture positive avec une dilution égale ou inférieure au 1/120. Ce résultat est absolument super-

posable à celui obtenu avec le phénol seul. Le Mn++ est donc ici sans action.

2° Vis-à-vis du Staphylocoque doré, le résultat est encore identique à celui du phénol seul.

On peut donc conclure que le Mn++ n'a manifesté aucune action de renforcement du pouvoir bactéricide du phénol.

B. — *Action du Mn++ sur le thymolsulfonate et le carvacrolsulfonate de sodium :*

L'activité bactéricide de ces deux substances chimiques, associées au Mn++, présent à la concentration de 0 gr. 08 par litre, s'est révélée semblable à celle qu'ont manifestée les substances seules : toutes les cultures ont poussé, aussi bien vis-à-vis du Colibacille que du Staphylocoque doré, et cela même avec une concentration en antiseptique du 1/20 et pour un temps de contact de 15 minutes.

Nota. — Ces conclusions nous ont amené à répéter nos essais en réalisant une concentration plus forte en ion métallique : au lieu d'incorporer une seule goutte de la solution mère de métal, nous avons successivement envisagé l'action éventuelle de 2, 3 et même 4 gouttes. Les résultats furent identiques à ceux fournis par l'incorporation d'une seule goutte.

Conclusion : « Le Mn++, dans les conditions expérimentales retenues, ne manifeste aucune action de renforcement du pouvoir bactéricide du phénol, du thymolsulfonate et du carvacrolsulfonate de sodium. »

III. — *ACTION DE Ag+*

Si le Cu++ et le Mn++ n'ont à leur actif qu'un pouvoir faible ou nul de renforcement de l'activité bactéricide du phénol, du thymolsulfonate et du carvacrolsulfonate de sodium, par contre, l'ion Ag+ nous a donné à ce point de vue, et avec ces mêmes substances, des résultats remarquables dont l'intérêt légitime un exposé plus détaillé.

Deux précisions préliminaires s'imposent ici : l'une concerne le processus d'expérimentation suivi, l'autre intéresse le degré de concentration en ion Ag+.

— Le processus d'expérimentation correspond exactement à celui que nous avons décrit et employé pour les autres sels métalliques. Néanmoins, pour diminuer les causes d'erreur et donner à nos conclusions une valeur accrue d'exactitude et de comparaison, nous avons,

dans chaque cas et en même temps, fait deux essais bactéricides : un premier avec la substance antiseptique seule et un deuxième, similaire et *concomitant*, avec la substance additionnée de métal.

Les conditions expérimentales présentent, de ce fait, une similitude plus absolue et le rapprochement des résultats acquiert une valeur comparative plus grande. Cette double épreuve nous a permis de contrôler, si besoin était, la valeur des résultats déjà acquis, au cours des essais bactéricides des substances antiseptiques seules, résultats que nous avons exposés dans le chapitre premier de cette section et qui, d'ailleurs, ont toujours été concordants. C'est pourquoi nous les avons retenus dans le rapprochement de nos conclusions. Mais il fallait tout de même préciser que ces deux déterminations expérimentales ont été *concomitantes.*

— L'ion Ag+ est incorporé sous forme d'une solution de So^4Ag^2, dont les caractéristiques ont été exposées dans le tableau figurant à la page 39. On incorpore 1 goutte de cette solution aux 5 cc. de la solution antiseptique, préalablement introduits dans chaque tube. La valeur de cette goutte correspondant à 0 gr. 0000322 d'ion Ag+, *nous obtenons ainsi une concentration par litre en ion Ag+ de : 0 gr. 00644.* Ce sera la concentration réalisée dans *tous* les essais bactéricides qui vont suivre ; son uniformité nous dispensera, en conséquence, de la préciser à nouveau, au fur et à mesure du déroulement de nos expériences. Il n'est pas inutile de souligner la faiblesse de cette concentration, surtout si on la compare à celles qui ont été respectivement fixées pour les deux autres métaux, celle du Cu++ étant de 0 gr. 0868 et celle du Mn++ de 0 gr. 08 par litre. L'action éventuelle de renforcement de l'ion Ag+ n'en sera que plus probante et plus sensible.

Comme pour les autres métaux, nous étudierons, tour à tour, cette influence de Ag+ vis-à-vis du Colibacille et du Staphylocoque doré.

Voici à présent nos résultats :

A. — Action de Ag+ sur le pouvoir bactéricide du phénol

Le tableau schématique suivant représente synthétiquement l'ensemble des résultats obtenus à la suite de nombreuses expériences.

Phénol (conc.)	Phénol et Colibacille Temps de contact			Phénol et Staphylocoque Temps de contact		
	5'	10'	15'	5'	10'	15'
1/180	—	—	—	—	—	—
1/220	±	—	—	—	—	—
1/240	+	—	—	+	—	—
1/260	+	±	—	+	±	—
1/280	+	+	±	+	+	±
1/300	+	+	+	+	+	+

Pour mettre en relief l'influence de l'ion Ag+, rapprochons, dans un nouveau tableau général, les résultats ci-dessus de ceux obtenus avec le phénol seul. Il convient de rappeler que les dilutions indiquées correspondent aux doses bactéricides limites, au delà desquelles nous n'avons jamais obtenu de subculture positive.

Substances	Vis-à-vis du Colibacille Temps de contact			Vis-à-vis du Staphylocoque doré Temps de contact		
	5'	10'	15'	5'	10'	15'
Phénol seul	1/100	1/120	1/130	1/80	1/110	1/120
Phénol + Ag+	1/180	1/240	1/260	1/220	1/240	1/260

Ces rapprochements nous permettent de tirer les *conclusions* suivantes:

1° Influence de Ag+ sur le pouvoir bactéricide du phénol vis-à-vis du *Colibacille :*

Avec le phénol seul, les dilutions pour lesquelles nous n'avons jamais eu de subculture positive correspondent au 1/100 avec un temps de contact de 5 minutes, au 1/120 pour 10 minutes et au 1/130 pour 15 minutes : après intervention de l'ion Ag+, à la concentration désignée, ces dilutions sont respectivement remplacées par les suivantes : 1/180 pour 5 minutes, 1/240 pour 10 minutes et 1/260 pour 15 minutes.

« L'ion Ag+ exerce donc sur le pouvoir bactéricide du phénol, vis-à-vis du Colibacille, une action de renforcement remarquable ; après un contact de 10 minutes, le pouvoir bactéricide du phénol est *doublé.* »

2° Vis-à-vis du *Staphylocoque doré*, l'influence de l'ion Ag+ est encore plus sensible. Les doses antibiotiques se rapportant à la mise en œuvre du phénol seul sont ici de : 1/80, 1/110 et 1/120, toujours pour des temps de contact de 5, 10 et 15 minutes ; après intervention de Ag+, ces dilutions sont remplacées par les suivantes : 1/220, 1/240 et 1/260. Ce renforcement revêt un intérêt encore plus sensible, si l'on songe que le Staphylocoque doré manifeste généralement une sensibilité moins grande que le Colibacille aux substances antiseptiques.

En conclusion, nous pouvons dire que le métal Ag+, associé au phénol, même à très faible dose, communique à ce dernier, et cela aussi bien vis-à-vis du Colibacille que du Staphylocoque doré, un renforcement notable de son activité bactéricide. Cet accroissement présente un grand intérêt, et cela d'autant plus que nous allons déceler une influence, certes moindre, mais tout de même similaire de cet ion Ag+, lorsqu'on l'associe au thymolsulfonate de sodium.

B. — Action de Ag^+ sur le pouvoir bactéricide du thymolsulfate de sodium :

Certains résultats réguliers et constants ont été enregistrés ici et sont loin d'être dépourvus d'intérêt, comme nous allons le voir. Résumons-les dans le tableau suivant :

TH-Na (conc.)	TH-Na et COLIBACILLE			TH-Na et STAPHYLOCOQUE DORE		
	Temps de contact			Temps de contact		
	5'	10'	15'	5'	10'	15'
1/20	+	—	—	+	—	—
1/30	+	±	—	+	±	—
1/40	+	+	±	+	+	—
1/50	+	+	+	+	+	±

Rappelons que le thymolsulfonate de sodium, employé seul, n'a manifesté aucune action bactéricide, aussi bien vis-à-vis du Colibacille que du Staphylocoque doré, et cela même en opérant à une concentration du 1/20 et pour un temps de contact de 15 minutes.

En regard de ces résultats, le tableau ci-dessus met en relief l'influence de l'ion Ag^+. En effet :

1° Vis-à-vis du Colibacille, nous enregistrons des subcultures négatives avec une concentration en TH-Na du 1/20, pour un temps de contact de 10 minutes entre l'antiseptique et le germe. Le même résultat est obtenu avec une concentration du 1/30, si l'on se rapporte à un temps de contact de 15 minutes.

2° Vis-à-vis du Staphylocoque doré, le résultat est identique pour 10 minutes de contact : il est encore plus sensible si l'on envisage une durée de 15 minutes, pour laquelle la subculture qui correspond à la dilution du 1/40 ne pousse pas.

C. — Action de Ag^+ sur le pouvoir bactéricide du carvacrolsulfonate de sodium :

Avec cette substance, les résultats sont, par contre, tous négatifs.

Nous avons vu que ce sel, employé seul, ne manifestait aucune activité microbicide, même à la concentration du 1/20 et pour un temps de contact de 15 minutes ; et cela aussi bien vis-à-vis du Colibacille que du Staphylocoque doré.

L'addition de l'ion Ag+ ne modifie aucun de ces résultats : toutes les subcultures ont poussé ; ce qui nous autorise à conclure à l'inefficacité de l'ion Ag+ sur le pouvoir bactéricide de cette substance.

Résumons les résultats obtenus avec l'ion Ag+ par les deux tableaux suivants, intéressant respectivement le Colibacille et le Staphylocoque doré.

1° *Vis-à-vis du Colibacille :*

SUBSTANCES	DOSES BACTERICIDES			ACTION DE Ag+		
	Temps de contact			Temps de contact		
	5'	10'	15'	5'	10'	15'
Phénol seul	1/100	1/120	1/130			
Phénol + Ag+	1/180	1/240	1/260	+ +	+ +	+ +
TH-Na seul	inactif	inactif	inactif			
TH-Na + Ag+	inactif	1/20	1/30	0	+	+
CA-Na seul	Inactif	inactif	inactif			
CA-Na + Ag+	inactif	inactif	inactif	0	0	0

2° *Vis-à-vis du Staphylocoque doré :*

SUBSTANCES	DOSES BACTERICIDES			ACTION DE Ag+		
	Temps de contact			Temps de contact		
	5'	10'	15'	5'	10'	15'
Phénol seul	1/80	1/110	1/115			
Phénol + Ag+	1/220	1/240	1/260	+ + +	+ + +	+ + +
TH-Na seul	inactif	inactif	inactif			
TH-Na + Ag+	inactif	1/20	1/40	0	+	+ +
CA-Na seul	inactif	inactif	inactif			
CA-Na + Ag+	inactif	inactif	inactif	0	0	0

L'ion Ag+ est donc capable, même à très faibles doses, de renforcer d'une façon notoire certaines activités bactéricides :

— le phénol voit son pouvoir antibiotique doubler :

— le TH-Na inactif accuse, en présence de Ag^+, une activité microbicide inexistante auparavant ;

— seul le CA-Na ne manifeste aucun changement d'activité après l'incorporation de Ag^+ : ce fait ne nous autorise pas pour autant à conclure, d'une façon peut-être prématurée, que l'ion Ag^+ est sans action sur les propriétés antibiotiques de ce sel : n'est-il pas absolument possible que nous assistions simplement à un renforcement insuffisant et, dès lors, incapable de se manifester dans les conditions expérimentales envisagées ?

CONCLUSIONS

L'étude des métaux, en tant qu'agents susceptibles de renforcer le pouvoir *bactéricide* de certains antiseptiques, nous a permis d'aboutir à des conclusions très intéressantes. Nous allons en faire la synthèse dans quelques tableaux, sur lesquels nous grouperons les résultats concernant chaque substance antiseptique : puis, par des graphiques, nous mettrons en relief l'action respective de chaque métal envisagé. Pour la clarté de l'exposition, nous examinerons tour à tour, les résultats intéressant le Colibacille, puis ceux qui se rapportent au Staphylocoque doré.

INFLUENCE DES METAUX VIS-A-VIS DU COLIBACILLE

Substances	Doses bactéricides — Temps de contact 5'	10'	15'	Action des ions : Cu++ Mn++ et Ag+
Phénol seul	1/100	1/120	1/130	
— + Cu++	1/120	1/130	1/140	+
— + Mn++	1/100	1/120	1/130	0
— + Ag+	1/180	1/240	1/260	+++ ++
TH-Na seul	inactif	inactif	inactif	
— + Cu++	inactif	inactif	inactif	0
— + Mn++	inactif	inactif	inactif	0
— + Ag+	inactif	1/20	1/30	++
CA-Na seul	inactif	inactif	inactif	
— + Cu++	inactif	inactif	inactif	0
— + Mn++	inactif	inactif	inactif	0
— + Ag+	inactif	inactif	inactif	0

Faisons un rapprochement identique avec les résultats obtenus par les mêmes substances vis-à-vis du Staphylocoque doré :

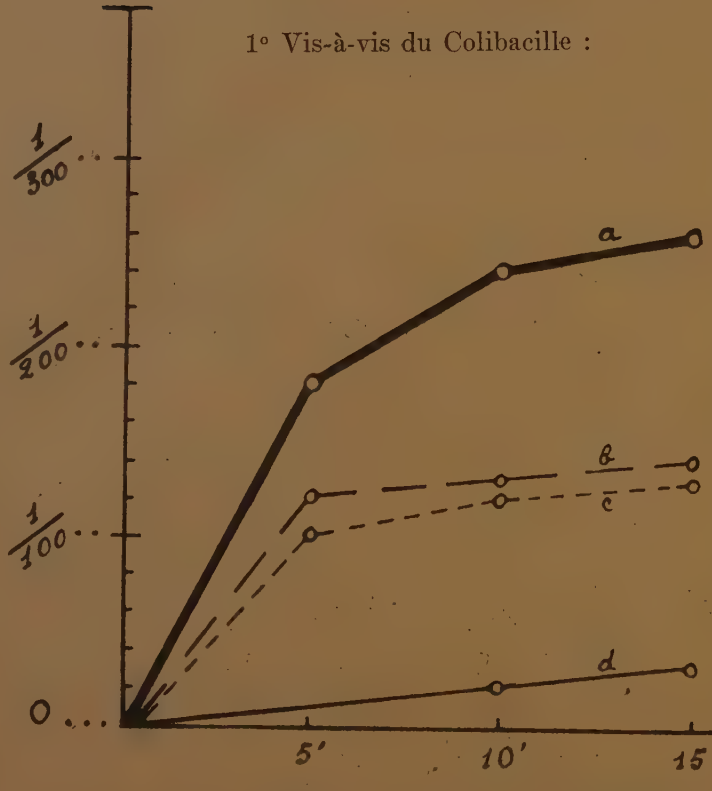
INFLUENCE DES METAUX VIS-A-VIS DU STAPHYLOCOQUE DORE

Substances	Doses bactéricides — Temps de contact 5'	10'	15'	Action des ions : Cu++ Mn++ et Ag+
Phénol seul	1/80	1/110	1/115	
— + Cu++	1/90	1/110	1/115	0
— + Mn++	1/80	1/110	1/115	0
— + Ag+	1/220	1/240	1/260	+++++
TH-Na seul	inactif	inactif	inactif	
— + Cu++	inactif	inactif	inactif	0
— + Mn++	inactif	inactif	inactif	0
— + Ag+	inactif	1/20	1/40	++
CA-Na seul	inactif	inactif	inactif	
— + Cu++	inactif	inactif	inactif	0
— + Mn++	inactif	inactif	inactif	0
— + Ag+	inactif	inactif	inactif	0

Portons sur des graphiques les valeurs positives de ces tableaux. Notons sur l'axe des abscisses les temps d'action des substances antiseptiques, employées seules ou éventuellement avec les métaux et sur l'axe des ordonnées les valeurs qui traduisent leur pouvoir antibiotique. Nous obtenons des courbes qui mettent bien en relief l'influence respective de chaque ion métallique sur les substances envisagées.

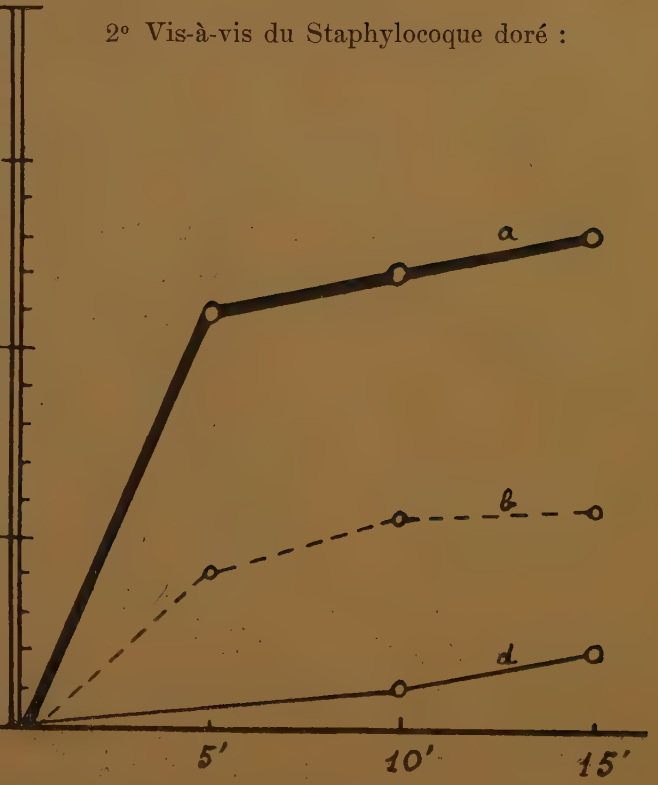
Influence des ions métalliques (Cu++, Mn++ et Ag+)
sur le pouvoir bactéricide *du phénol et du thymolsulfonate de sodium*

1° Vis-à-vis du Colibacille :



Phénol + Ag+ = a ——
Phénol + Cu++ = b — — —
Phénol seul ou
Phénol + Mn++ = c ----------

2° Vis-à-vis du Staphylocoque doré :



Phénol + Ag+ = a ——
Phénol seul ou
Phénol + Cu++ ou
Phénol + Mn++ = b ----------

Des tableaux et graphiques précédents, nous pouvons tirer les conclusions suivantes, au sujet du renforcement du pouvoir *bactéricide* des substances envisagées.

Trois ions métalliques : le Cu++, le Mn++ et l'Ag+ ont été tour à tour associés au phénol, au thymolsulfonate et au carvacrolsulfonate de sodium, en vue de déceler un renforcement éventuel du pouvoir bactéricide de ces dernières substances. Les conditions expérimentales ont été choisies de façon telle, que l'on ne puisse rapporter à la seule substance antiseptique ou au seul ion métallique incorporé les résultats observés.

Le tableau suivant prouve que les ions métalliques ont été incorporés, dans nos essais, à une concentration telle, qu'il est impossible d'attribuer à leur activité propre le renforcement du pouvoir bactéricide des substances organiques envisagées :

Quantités de métal, en grammes, par litre, qui, *employées isolément*, ont été incapables de tuer les germes :	Quantités de métal, en grammes, par litre, choisies pour les essais bactéricides :
Ag+ = 0.03864	Ag+ = 0.00644
Cu++ = 0.5208	Cu++ = 0.0868
Mn++ = 0.4800	MN++ = 0.0800

Voyons à présent, l'une après l'autre, l'influence respective de chaque ion métallique, incorporé à la concentration qui vient d'être précisée :

A. — *Influence de l'ion Ag+ :*

1° L'ion Ag+ s'est révélé, à ce point de vue, et de loin, le plus actif des trois.

2° Son influence n'est pas uniforme :

a) Sur le phénol, elle est remarquable, puisqu'elle double le pouvoir bactéricide de cette substance ; en effet, si nous examinons, par exemple, les résultats se rapportant au temps de contact de 10 minutes, nous observons les faits suivants :

— Vis-à-vis du Colibacille, le phénol, employé seul, n'a tué ce germe qu'à une concentration du 1/120 (soit 8 gr. 33 pour mille) ; associé à Ag+, il donne le même résultat, dès la concentration du 1/240 (soit : 4 gr. 16 pour mille) ;

— Vis-à-vis du Staphylocoque doré, la concentration du 1/110 (soit : 9 gr. 09 p. mille), qui correspond à la dose bactéricide du phénol employé seul, n'est plus que de 1/240 (soit : 4 gr. 16 p. mille), après incorporation de Ag+.

b) Le TH-Na acquiert, à son contact, une certaine activité microbicide qu'il ne manifestait pas auparavant : employé seul, en effet, il est inactif vis-à-vis des deux germes, même à la concentration du 1/20 (soit : 50 grs p. mille) ; après incorporation de Ag+, il tue les mêmes germes à cette même concentration ;

c) Le CA-Na demeure absolument inactif.

3° Cette influence de l'ion Ag+ varie, selon qu'elle s'exerce vis-à-vis du Colibacille ou du Staphylocoque doré : ainsi, le phénol est activé d'une façon à la fois plus sensible et plus rapide, au contact du Staphylocoque que du Colibacille. Ce fait mérite d'autant plus d'être signalé, que généralement le Staphylocoque s'avère, au contraire, moins sensible que le Colibacille à l'action des antiseptiques.

B. — *Influence de l'ion Cu++ :*

Le Cu++ n'a manifesté une telle influence synergique que dans un seul cas : elle affecte le pouvoir bactéricide du phénol déterminé vis-à-vis du Colibacille et encore de façon fort discrète ; avec le Staphylocoque, son intervention s'avère inefficace.

C. — *Influence de l'ion Mn++ :*

L'influence de l'ion Mn++ s'est, dans tous les cas, révélée nulle.

PARAGRAPHE DEUXIEME

RENFORCEMENT DU POUVOIR BACTÉRIOSTATIQUE

L'étude des métaux considérés comme agents éventuels de renforcement de l'activité des substances antimicrobiennes, doit envisager, après l'examen du pouvoir bactéricide, celui du pouvoir bactériostatique.

Un sel métallique associé même à faible dose à un corps antiseptique est-il capable d'accroître le pouvoir bactériostatique de ce dernier ? Dans l'affirmative, les renforcements ainsi décelés sont-ils comparables à ceux du pouvoir bactéricide de ces mêmes agents antimicrobiens ?

Afin de pouvoir répondre à ces questions, nous avons adopté ici le même plan d'expérimentation qui a été suivi pour l'étude du pouvoir bactéricide, et qui comporte, ainsi que nous l'avons déjà indiqué, trois temps :

1° La détermination du pouvoir bactériostatique propre des substances envisagées ;

2° L'étude de l'action bactériostatique propre des sels métalliques incorporés ;

3° Enfin, la détermination du nouveau pouvoir bactériostatique accusé par les substances antiseptiques envisagées, mais associées cette fois-ci aux sels métalliques.

Notre expérimentation s'appliquera ici aux mêmes substances dont nous avons déjà envisagé l'étude du pouvoir bactéricide, c'est-à-dire : au phénol, au thymolsulfonate de sodium et au carvacrolsulfonate de sodium. La méthode utilisée est celle qui a été décrite dans la deuxième partie de notre travail (pages 44 et 45). Comme organismes témoins, nous avons ici encore retenu le Colibacille et le Staphylocoque doré.

CHAPITRE PREMIER

POUVOIR BACTERIOSTATIQUE PROPRE DES SUBSTANCES ENVISAGEES (phénol-TH-Na et CA-Na) :

Le tableau qui va suivre résume les caractéristiques des solutions d'antiseptiques utilisées. Chaque série d'essais comporte plusieurs tubes, contenant chacun un volume uniforme d'eau peptonée (soit 5 centimètres cubes) et recevant successivement sous forme de gouttes, une quantité croissante de l'antiseptique envisagé. La tableau suivant précise les concentrations par litre obtenues de cette façon en antisep-

tique, selon le nombre de gouttes incorporées. Nous avons précisé les concentrations qui correspondent aux dix premières gouttes, puisque, dans les essais qui vont suivre, nous avons, pour chaque substance, établi une série de dix tubes recevant respectivement de 1 à 10 gouttes.

I. — *Phénol :*

Voici les résultats concernant le phénol seul :

Concentration en phénol, par litre (en grammes)	Vis-à-vis du Colibacille	Vis-à-vis du Staphylocoque doré
0.312	+	+
0.624	+	+
0.936	+	+
1.248	+	+
1.560	+	+
1.872	+	+
2.184	+	+
2.496	—	—
2.808	—	—
3.120	—	—

« Le phénol accuse donc un pouvoir bactériostatique égal vis-à-vis du Colibacille et du Staphylocoque doré : pour ces deux microbes, nous n'avons jamais obtenu de culture négative avec une concentration en phénol et par litre inférieure à 2 grs 496. Cette concentration correspond à celle qui a été suffisante mais nécessaire pour inhiber la culture. »

II. — *Thymolsulfonate et carvacrolsulfonate de sodium :*

Les résultats concernant ces deux substances sont absolument superposables : aussi bien vis-à-vis du Colibacille que vis-à-vis du Staphylocoque doré, ces deux substances n'ont manifesté aucune action bactériostatique et cela même avec une concentration par litre de 12 grs 80.

Conclusion :

L'étude du pouvoir bactériostatique propre des trois substances envisagées, nous a donné les résultats suivants, qui sont valables aussi bien pour le Colibacille que vis-à-vis du Staphylocoque doré :

— pour le phénol, la dose bactériostatique correspond à une concentration par litre de 2 grs 496 ;

— le TH-Na et le CA-Na n'ont manifesté aucune action inhibitrice, même avec une concentration de 12 grs 80 par litre.

CHAPITRE DEUXIEME

POUVOIR BACTERIOSTATIQUE PROPRE DES SELS METALLIQUES :

Comme pour le pouvoir bactéricide, nous avons successivement envisagé l'action des trois ions Cu++, Mn++ et Ag+. Les solutions mères utilisées (solutions de sulfates) sont les mêmes que celles des essais bactéricides. Leurs caractéristiques sont précisées au tableau figurant à la page 39). Rappelons leur concentration respective :

— Solution de So^4Cu : 1 cm3 = 0 gr. 010 de Cu++
(1 goutte = 0 gr. 00043)

— Solution de So^4Mn : 1 cm3 = 0 gr. 010 de Mn++
(1 goutte = 0 gr. 0004)

— Solution de So^4Ag : 1 cm3 = 0 gr. 001 de Ag+
(1 goutte = 0 gr. 0000322)

Voici à présent, condensés en un seul tableau, tous les résultats concernant le pouvoir bactériostatique propre des trois ions métalliques :

Conc. en Cu++ par litre (gramme)	Doses bactériostatiques vis-à-vis du		Conc. en Mn++ par litre (gramme)	Doses bactériostatiques vis-à-vis du		Conc. en Ag+ par litre (gramme)	Doses bactériostatiques vis-à-vis du	
	Coli.	Staphylo		Coli.	Staphylo		Coli.	Staphylo
0.0868	+	+	0.0800	+	+	0.00644	+	+
0.1736	+	+	0.1600	+	+	0.01288	.. —	... —
0.2604	+	+	0.2400	+	+	0.01932	—	—
0.3472	+	.. —	0.3200	+	+	0.02576	—	—
0.4340	+	—	0.4000	+	+	0.03220	—	—
0.5208	.. —	—	0.4800	+	+	0.03864	—	—
0.6076	—	—	0.5600	+	... —	0.04508	—	—
0.6944	—	—	0.6400	—	—	0.05152	—	—
0.7812	—	—	0.7200	—	—	0.05796	—	—
0.8680	—	—	0.8000	—	—	0.06440	—	—

Ce tableau nous indique la concentration en ions métalliques qui a été, dans chaque cas, suffisante mais nécessaire pour obtenir l'effet bactériostatique.

1° Pour le Cu++ : les doses bactériostatiques correspondent respectivement aux concentrations en Cu++ par litre de :

0 gr. 5208 vis-à-vis du Colibacille et

0 gr. 3472 vis-à-vis du Staphylocoque doré.

2° Pour le Mn++ : les concentrations sont de :

0 gr. 6400 vis-à-vis du Colibacille et

0 gr. 5600 vis-à-vis du Staphylocoque doré.

3° Pour l'Ag+ : les résultats sont identiques vis-à-vis des deux micro-organismes ; il suffit d'une concentration par litre de 0 gr. 01288 en ion Ag+ pour inhiber le développement de la culture.

Conclusion :

Si nous rapprochons les doses bactériostatiques qui ont été obtenues, pour chaque ion métallique, dans les conditions expérimentales choisies, et notamment en utilisant l'eau peptonée comme milieu, nous aboutissons au tableau suivant :

Quantités de métal présentes dans un cm3 des solutions mères utilisées : (en grammes)	DOSES BACTERIOSTATIQUES intéressant les ions métalliques employés isolément (valeur en gramme p. mille)	
	vis-à-vis du Colibacille	vis-à-vis du Staphylocoque doré
Cu++ (1 cm3 = 0 gr. 010 de Cu++)	0.5208	0.3472
Mn++ (1 cm3 = 0 gr. 010 de Mn++)	0.6400	0.5600
Ag+ (1 cm3 = 0 gr. 001 de Ag+)	0.01288	0.01288

CHAPITRE TROISIEME

POUVOIR BACTERIOSTATIQUE DES SUBSTANCES ENVISAGEES (phénol-TH-Na et CA-Na) ASSOCIEES AUX METAUX :

Comme pour le pouvoir bactéricide, nous allons grouper les résultats intéressant chaque métal.

Pour faire la preuve que tout renforcement éventuel du pouvoir bactériostatique d'une de nos substances résulte strictement de l'influence synergique de l'ion métallique incorporé à cette dernière, nous ferons, dans chaque cas particulier, les deux rapprochements suivants :

— d'une part, nous comparerons le pouvoir bactériostatique propre de la substance chimique employée seule, à celui obtenu après incorporation de l'ion métallique et déterminé dans des conditions expérimentales absolument identiques ;

— d'autre part, pour prouver que le renforcement décelé n'est pas non plus imputable à la seule superposition de la propre activité de l'ion métallique incorporé, nous comparerons avant l'étude de chaque métal, la concentration en ion métallique réalisée pour nos essais, à celle qui a été nécessaire pour obtenir l'effet bactériostatique, en utilisant seulement l'ion métallique envisagé. Comme nous le verrons celle-là est toujours très inférieure à cette dernière.

Ces données légitiment à la fois les précisions qui figureront au début de l'étude de chaque métal et, en outre, la présentation générale de nos tableaux. Ainsi, l'action éventuelle de renforcement d'un ion métallique ressortira avec plus de relief.

Dans tous les essais qui vont suivre, nous ajoutons à chaque tube, contenant déjà l'eau peptonée et la substance antiseptique, un volume uniforme de la solution métallique envisagée, soit une goutte. La valeur de cette dernière n'étant pas la même pour les trois métaux, sera précisée avant l'étude de chacun d'eux. Rappelons toutefois que les solutions métalliques utilisées sont celles dont nous avons donné les caractéristiques à la page 39.

I. — *ACTION DU Cu++ :*

L'ion Cu++, employé seul, n'a déterminé l'effet bactériostatique qu'à la concentration par litre et en ions Cu++ de :

0 gr. 5208, vis-à-vis du Colibacille et
0 gr. 3472, vis-à-vis du Staphylocoque doré.

Pour les essais qui vont suivre, nous avons retenu la concentration uniforme et nettement inférieure de :

0 gr. 0868 en ions Cu++ par litre.

Nous l'obtenons en incorporant à chaque tube, une goutte de la solution mère de So^4Cu, dont la valeur en ions Cu++ est de : 0 gr. 00043.

Voici nos résultats :

A. — Phénol :

Conc. en phénol par litre (en grammes)	DOSES BACTERIOSTATIQUES			
	vis-à-vis du Colibacille		vis-à-vis du Staphylocoque doré	
	phénol seul	phénol — Cu++	phénol seul	phénol — Cu++
0.312	—	—	—	+
0.624	—	—	—	+
0.936	—	—	—	+
1.248	—	—	—	+
1.560	—	—	—	+
1.872	—	... —	—	+
2.184	—	—	—	+
2.496	... —	—	... —	+
2.808	—	—	—	+
3.120	—	—	—	+

L'influence de Cu++ sur le phénol est nettement différente selon le microbe pris comme organisme témoin :

— vis-à-vis du Colibacille, le phénol voit sa dose inhibitrice passer, grâce à l'intervention de Cu++, de :

2 gr. 496 à 1 gr. 872 (valeur de la conc. par litre)

— vis-à-vis du Staphylocoque doré, nous assistons à une curieuse anomalie : le Cu++ [illegible] le pouvoir bactériostatique du phénol. Ce résultat ne serait-il pas une conséquence de la salification, prouvant tout simplement que le phénate de cuivre serait moins antiseptique que le phénol ?

B. — Thymolsulfonate de sodium :

Conc. en TH-Na par litre (en grammes)	DOSES BACTERIOSTATIQUES VIS-A-VIS DU			
	Colibacille		Staphylocoque doré	
	TH-Na seul	TH-Na — Cu++	TH-Na seul	TH-Na — Cu++
1.28	—	—	—	—
2.56	+	+	+	+
3.84	+	+	+	+
5.12	+	+	+	+
6.40	+	+	+	+
7.68	+	+	+	+
8.96	+	—	—	—
10.24	+	+	+	... —
11.52	+	+	+	—
12.80	+	..... —	+	—

Conclusion : Vis-à-vis du Colibacille, le TH-Na donne avec Cu++ une culture négative pour une concentration de 12 gr. 80 ; à cette même concentration, mais sans Cu++, la culture a poussé. D'où, influence discrète mais réelle de Cu++.

— vis-à-vis du Staphylocoque doré, l'influence de Cu++ est plus sensible : l'effet antigénétique est obtenu dès la concentration de 10 gr. 24 par litre.

C. — Carvacrolsulfonate de sodium :

Les concentrations en CA-Na étudiées, sont les mêmes que pour le TH-Na : elles s'échelonnent de 1 gr. 28 à 12 gr. 80 par litre. Les résultats obtenus, en présence de Cu++, sont absolument superposables à ceux fournis par le CA-Na employé seul ; et cela aussi bien vis-à-vis du Colibacille que du Staphylocoque doré. Toutes les cultures poussent.

On peut donc conclure que Cu++ ne manifeste aucune influence sur cette substance.

II. — *ACTION DU Mn++ :*

L'ion Mn++ employé seul n'a manifesté l'effet bactériostatique qu'à la concentration par litre de :

0 gr. 6400, vis-à-vis du Colibacille et
0 gr. 5600, vis-à-vis du Staphylocoque doré.

Nous avons réalisé pour les essais suivants, la concentration de :
0 gr. 0800, par litre, en ions Mn++.

Nous l'obtenons en ajoutant à chaque tube, une goutte de la solution mère de So4Mn, goutte dont la valeur en ions Mn++ est de : 0 gr. 0004.

Voici nos résultats :

A. — Phénol :

Conc. en phénol par litre (en grammes)	DOSES BACTERIOSTATIQUES			
	vis-à-vis du Colibacille		vis-à-vis du Staphylocoque doré	
	phénol seul	phénol + Mn++	phénol seul	phénol + Mn++
0.312	+	+	+	+
0.624	+	+	+	+
0.936	+	+	+	+
1.248	+	+	+	+
1.560	+	+	+	+
1.872	+	—	+	+
2.184	+	—	+	+
2.496	—	—	—	+
2.808	—	—	—	+
3.120	—	—	—	+

Conclusion : vis-à-vis du Colibacille : le Mn++ exerce une certaine influence sur le phénol, qui voit sa dose bactériostatique passer de : 2 gr. 496 à 1 gr. 872 par litre.

— vis-à-vis du Staphylocoque doré : une anomalie est à signaler : il s'agit de la *diminution* du pouvoir bactériostatique du phénol, du fait de la présence de Mn++. Ce fait est d'autant plus curieux que le Mn++, agissant vis-à-vis du Colibacille dans les mêmes conditions expérimentales, a manifesté au contraire, avec le même phénol, une action de renforcement de son pouvoir antigénétique.

Cela laisserait supposer :

— d'une part, que le phénate de manganèse a sur le Colibacille une action bactériostatique plus forte que celle du phénol ;

— d'autre part, que ce même phénate de manganèse aurait sur le Staphylocoque doré, une action moins sensible que celle exercée par le phénol.

Ainsi donc, dans ce cas-là, la salification serait susceptible d'agir en sens opposé, selon que l'expérimentation s'effectuerait vis-à-vis du Colibacille ou du Staphylocoque doré.

B. — Thymolsulfonate et carvacrolsulfonate de sodium :

Sur ces deux substances le Mn++ n'a manifesté aucune influence : aussi bien vis-à-vis du Colibacille que du Staphylocoque doré, toutes les cultures ont poussé et cela, soit en utilisant les substances seules, soit après leur avoir incorporé l'ion Mn++. Les concentrations en TH-Na et CA-Na envisagées s'échelonnaient de : 1 gr. 28 à 12 gr. 80 par litre.

III. — *ACTION DE Ag+ :*

L'ion Ag+, employé seul, a produit l'effet bactériostatique, vis-à-vis du Colibacille et du Staphylocoque doré, à la concentration de 0 gr. 01288, par litre.

Dans les essais suivants, intéressant ce métal, nous avons été amenés, dans le cas du phénol, à réaliser une concentration très faible en ions Ag+ : en effet, la simple addition, dans chaque tube, d'une seule goutte de la solution mère de So4Ag2 suffisait pour inhiber le développement de toutes les cultures. La concentration en ions Ag+ ainsi réalisée était de : 0 gr. 00644 par litre.

Devant un tel résultat, nous avons dû faire appel à une solution de So4Ag2 dix fois plus diluée : 1 cm3 de cette dernière correspond donc à 0 gr. 0001 d'ions Ag+ (1/10 de milligramme) et une goutte à 0 gr. 00000322. La concentration par litre en ions Ag+ obtenue par incorporation de une goutte de cette solution aux 5 c.c. de

chaque tube est par conséquent de : 0 gr. 000644. Telle est la concentration choisie pour l'étude du phénol.

Pour les autres substances (TH-Na et CA-Na), nous avons incorporé aux 5 c.c. de chaque tube, une goutte de la solution mère initiale de $So4Ag2$, ce qui nous donne une concentration par litre, en ions Ag+, de : 0 gr. 00644.

En résumé, le pouvoir de renforcement de l'ion Ag+ sera étudié, dans les essais qui vont suivre, à la concentration en ions Ag+ de :

— 0 gr. 000644 par litre, pour le phénol, et

— 0 gr. 00644 par litre, pour le TH-Na et le CA-Na.

Voici nos résultats :

A. — Phénol :

Conc. en phénol par litre (en grammes)	DOSES BACTERIOSTATIQUES VIS-A-VIS DU			
	Colibacille		Staphylocoque doré	
	phénol seul	phénol + Ag+	phénol seul	phénol + Ag+
0.312	+	+	+	+
0.624	+	+	+	+
0.936	+	+	+	+
1.248	+	+	+	..... —
1.560	+	.... —	+	—
1.872	+	—	+	—
2.184	+	—	+	—
2.496	.... —	—	.... —	—
2.808	—	—	—	—
3.120	—	—	—	—

Conclusion : L'ion Ag+ renforce de façon notoire le pouvoir antigénétique du phénol :

— Vis-à-vis du Colibacille, la dose bactériostatique de cette substance passe de : 2.496 à 1.560. (Ces doses, exprimées en grammes, correspondent à la concentration en phénol par litre qui est nécessaire pour obtenir l'effet bactériostatique.)

— Vis-à-vis du Staphylocoque doré, le renforcement imputable à l'ion Ag+ est encore plus sensible : la dose bactériostatique du phénol passe de 2.496 à 1.248 ; elle est donc approximativement diminuée de moitié.

B. — Thymolsulfonate de sodium :

Conc. en TH-Na par litre (en grammes)	DOSES BACTERIOSTATIQUES VIS-A-VIS DU :			
	Colibacille		Staphylocoque doré	
	TH-Na seul	TH-Na + Ag+	TH-Na seul	TH-Na + Ag+
1.28	+	+	+	+
2.56	+	+	+	+
3.84	+	+	+	... —
5.12	+	+	+	—
6.40	+	+	+	—
7.68	+	... —	+	—
8.96	+	—	+	—
10.24	+	—	+	—
11.52	+	—	+	—
12.80	+	—	+	—

Conclusion : Le TH-Na accuse, après intervention de l'ion Ag+, un accroissement considérable de son pouvoir bactériostatique :

— Vis-à-vis du Colibacille, alors que cette substance ne manifeste aucune activité antigénétique, même à la forte concentration de 12 gr. 80 par litre lorsqu'on l'emploie seule, après incorporation de l'ion Ag+, une concentration de 7 gr. 68 par litre en TH-Na donne une culture négative.

— Vis-à-vis du Staphylocoque doré, le renforcement imputable à Ag+ est encore plus étendu : initialement inactif, même à la concentration de 12 gr. 80 par litre, le TH-Na, après intervention de Ag+, inhibe la culture, pour une concentration de : 3 gr. 84 par litre.

C. — Carvacrolsulfonate de sodium :

Conc. en CA-Na par litre (en grammes)	DOSES BACTERIOSTATIQUES			
	vis-à-vis du Colibacille		vis-à-vis du Staphylocoque doré	
	CA-Na seul	CA-Na + Ag+	CA-Na seul	TH-Na + Ag+
1.28	+	+	+	+
2.56	+	+	+	+
3.84	+	+	+	+
5.12	+	... —	+	+
6.40	+	—	+	+
7.68	+	—	+	... —
8.96	+	—	+	—
10.24	+	—	+	—
11.52	+	—	+	—
12.80	+	—	+	—

Conclusion : Le CA-Na, inactif vis-à-vis des deux microbes lorsqu'on l'emploie seul, même à la forte concentration de 12 gr. 80 par litre, aboutit à l'effet bactériostatique dès la concentration par litre de :

— 5 gr. 12, vis-à-vis du Colibacille et

— 7 gr. 68, vis-à-vis du Staphylocoque doré, après incorporation de l'ion Ag+.

Résumons, dans un tableau général, les résultats donnés par l'ion Ag+ dans l'étude des pouvoirs bactériostatiques :

Substances envisagées	Quantités en grs de métal Ag+ présentes par litre :	DOSES BACTERIOSTATIQUES (Conc. en grammes par litre de la substance chimique envisagée)	
		vis-à-vis du Colibacille	vis-à-vis du Staphylocoque doré
Phénol seul		2.496	2.496
Phénol + Ag+	0.000644	1.560	1.248
TH-Na seul		inactif même à une conc. de : 12.80 par litre	inactif même à une conc. de : 12.80 par litre
TH-Na + Ag+	0.00644	7.68	3.84
CA-Na seul		inactif même à une conc. de : 12.80 par litre	inactif même à une conc. de : 12.80 par litre
CA-Na + Ag+	0.00644	5.12	7.68

Comme en témoigne le tableau ci-dessus, l'ion Ag+ renforce d'une façon notoire tous les pouvoirs bactériostatiques des trois substances chimiques envisagées. On doit surtout souligner le renforcement de l'activité antigénétique du phénol : cette influence est d'autant plus énergique qu'elle est imputable, dans ce cas-là, à une très faible concentration en ions Ag+.

CONCLUSIONS

Condensons en un seul tableau tous les résultats qui intéressent l'action de renforcement exercée par les trois ions métalliques envisagés, sur le pouvoir bactériostatique des trois substances chimiques étudiées.

Quantités de métal présentes en grs par litre :	SUBSTANCES CHIMIQUES	DOSES BACTERIOSTATIQUES (conc. en grs. par litre des substances chimiques) vis-à-vis du	
		Colibacille	Staphylocoque doré
	phénol seul	2.496	2.496
0.0868	» + Cu^{++}	1.872	Inactif avec 3.120 p. mille
0.0800	» + Mn^{++}	1.872	Inactif avec 3.120 p. mille
0.000644	» + Ag^{+}	1.560	1.248
	TH.Na seul	Inactif à 12.80 p. mille	Inactif à 12.80 p. mille
0.0868	» + Cu^{++}	12.80	10.24
0.0800	» + Mn^{++}	Inactif à 12.80 p. mille	Inactif à 12.80 p. mille
0.00644	» + Ag^{+}	7.68	3.84
	CA.Na seul	Inactif à 12.80 p. mille	Inactif à 12.80 p. mille
0.0868	» + Cu^{++}	Inactif à 12.80 p. mille	Inactif à 12.80 p. mille
0.0800	» + Mn^{++}	Inactif à 12.80 p. mille	Inactif à 12.80 p. mille
0.00644	» + Ag^{+}	5.12	7.68

Du tableau précédent, nous pouvons tirer les conclusions suivantes, au sujet du renforcement, par les ions métalliques essayés, du pouvoir *bactériostatique* des trois substances organiques envisagées :

1° *Influence de Ag+.* — L'ion Ag+ a manifesté l'action la plus générale et la plus profonde : les trois substances chimiques étudiées accusent toutes, grâce à son intervention, un pouvoir antigénétique sensiblement accru, et cela aussi bien vis-à-vis du Colibacille que du Staphylocoque doré :

a) Ainsi, le pouvoir bactériostatique du phénol est doublé ;

b) Le TH-Na, employé seul, n'a manifesté aucune activité, même à la concentration de 12 gr. 80 par litre ; associé à Ag+, il provoque l'inhibition des cultures aux concentrations de 7 gr. 68 vis-à-vis du Colibacille et 3 gr. 84 vis-à-vis du Staphylocoque doré ;

c) Le CA-Na, également inactif à la concentration de 12 gr. 80 pour mille, accuse, en présence de Ag+, des doses bactériostatiques de 5 gr. 12 vis-à-vis du Colibacille et 7 gr. 68 vis-à-vis du Staphylocoque doré.

Les concentrations en ion Ag+ par litre réalisées pour ces essais étaient de : 0 gr. 000644 pour le phénol et 0 gr. 00644 pour les deux autres substances organiques.

Rappelons que l'ion Ag+, employé seul, n'a produit l'arrêt de multiplication des germes qu'à la concentration de 0 gr. 01288 pour mille, et cela vis-à-vis du Colibacille ou du Staphylocoque doré.

2° *Influence de Cu++.* — L'action de Cu++ diffère encore selon la substance à laquelle il est associé :

a) Le phénol, qui, employé seul, accuse une dose bactériostatique de 2 gr. 496 vis-à-vis des deux microbes choisis, voit cette dernière passer à 1 gr. 872 vis-à-vis du Colibacille. Par contre, son activité diminue vis-à-vis du Staphylocoque doré, et là, il se montre inefficace même à une concentration de 3 gr. 120 par litre ;

b) Le TH-Na subit une légère influence de cet ion, surtout vis-à-vis du Staphylocoque doré ;

c) Enfin, le CA-Na n'accuse aucune modification d'activité.

La concentration en ions Cu++ réalisée dans tous ces essais (0 gr. 0868 par litre), était très inférieure à celles qui ont été nécessaires pour obtenir l'effet bactériostatique avec l'ion Cu++ employé seul et qui étaient de : 0 gr. 5208 vis-à-vis du Colibacille et 0 gr. 3472 vis-à-vis du Staphylocoque doré.

3° *Influence de Mn++.* — Le Mn++ s'avère le moins efficace des trois ions métalliques : un seul accroissement d'activité, d'ailleurs parallèle à celui manifesté par le Cu++ dans le même cas, peut être

cité à son actif : il intéresse le phénol, agissant vis-à-vis du Colibacille.

Par contre, le Mn++ diminue le pouvoir antigénétique du phénol agissant vis-à-vis du Staphylocoque doré ; cette anomalie est parallèle à celle que manifeste le Cu++ agissant également, de concert avec le phénol, vis-à-vis du Staphylocoque doré.

Le Mn++, employé seul, a exigé une concentration pour mille de : 0 gr. 6400 vis-à-vis du Colibacille et de 0 gr. 5600 vis-à-vis du Staphylocoque, pour produire l'effet bactériostatique. Ici, nos essais ont été effectués en présence d'une quantité de métal de 0 gr. 0800 par litre.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La première partie de nos recherches considère le pouvoir antiseptique des dérivés des essences. La détermination des causes de cette activité a suscité de nombreux travaux ; aux observations empiriques font suite, dans le temps, les recherches scientifiques : on essaie, par un travail d'analyse, d'isoler les principaux constituants des essences, puis de déterminer l'activité antibactérienne propre de chacun d'eux. Ainsi, furent tour à tour étudiés les dérivés du phénol, du thymol et du carvacrol. Nous nous sommes plus spécialement arrêtés aux dérivés sulfonés de ces substances organiques, pour essayer d'en préciser la valeur antibiotique.

Nous avons constaté que celle-ci était très faible, aussi bien vis-à-vis du Colibacille que du Staphylocoque doré. Il nous a paru alors intéressant de tenter une exaltation éventuelle du pouvoir antiseptique de quelques-unes de ces substances, par addition de faibles doses de certains ions métalliques.

Nous avons limité notre champ d'expériences à l'étude des trois substances organiques suivantes : phénol, thymolsulfonate et carvacrolsulfonate de sodium. Trois ions métalliques : Cu^{++}, Mn^{++} et Ag^{+} ont été tour à tour associés à chacune de ces substances, en vue de déceler un renforcement éventuel de leur activité soit bactéricide, soit bactériostatique.

Les conditions expérimentales ont été fixées de façon telle que l'on ne puisse rapporter à l'ion métallique seul les résultats observés. Nous précisons, dans les tableaux suivants, la valeur des différentes concentrations retenues pour nos essais ; nous les exprimons, d'abord en ions métalliques, puis en atomes-grammes, en faisant les rapports des concentrations en ions aux masses atomiques correspondantes.

A. — *RESULTATS CONCERNANT LE RENFORCEMENT DU POUVOIR BACTERICIDE :*

Le tableau suivant prouve que les ions métalliques ont été incorporés à des concentrations où, pris seuls, ils ne manifestent aucune activité antibiotique.

Quantités de métal, en grs. par litre, qui, *employées isolément*, ont été insuffisantes pour tuer des germes :	Quantités de métal, en grs. par litre, adoptées pour nos essais bactéricides :
1° Quantités exprimées en ions métalliques :	
$Ag^+ \geq 0$ gr. 03864	$Ag^+ = 0$ gr. 00644
$Cu^{++} = 0$ gr. 5208	$Cu^{++} = 0$ gr. 0868
$Mn^{++} = 0$ gr. 4800	$Mn^{++} = 0$ gr. 0800
2° Quantités exprimées en atomes-grammes :	
$Ag^+ = 3$ gr. 581 $\times 10^{-4}$	$Ag^+ = 0$ gr. 596 $\times 10^{-4}$
$Cu^{++} = 81$ gr. 92 $\times 10^{-4}$	$Cu^{++} = 13$ gr. 65 $\times 10^{-4}$
$Mn^{++} = 87$ gr. 38 $\times 10^{-4}$	$Mn^{++} = 14$ gr. 56 $\times 10^{-4}$

EN CONCLUSION :

1° L'ion Ag^+ s'est révélé, et de beaucoup, le plus actif :

— Sa présence, même à faible dose (0 gr. 00644 pour mille) double le pouvoir bactéricide du phénol : en effet, ce dernier, à la concentration de 4 gr. 16 p. mille, tue en 10 minutes le Colibacille, après incorporation de Ag^+ ; pour obtenir le même résultat sans Ag^+, la concentration de 8 gr. 33 p. mille est nécessaire.

Vis-à-vis du Staphylocoque doré, les résultats sont comparables. Le phénol est le plus activé par l'ion Ag^+.

— Le thymolsulfonate de sodium, à son contact, accuse une certaine activité microbicide qu'il ne manifestait pas auparavant.

— Seul, le carvacrolsulfonate de sodium ne subit aucune influence de cet ion.

Il faut signaler que l'influence de l'ion Ag^+ varie selon qu'il agit vis-à-vis du Colibacille ou du Staphylocoque doré.

2° L'ion Cu^{++} n'active que le pouvoir antibiotique du phénol, déterminé en présence du Colibacille ; et encore, ce renforcement est fort discret.

3° Enfin, l'ion Mn^{++} s'est, dans tous les cas, montré inactif.

B. — *RESULTATS CONCERNANT LE RENFORCEMENT DU POUVOIR BACTERIOSTATIQUE :*

Le tableau suivant prouve que les concentrations en ions métalliques, réalisées dans nos essais bactériostatiques, ne permettent pas d'attribuer aux seules activités de ces ions les résultats observés.

Quantités de métal, en grs. par litre, qui, *employées isolément*, ont été juste nécessaires pour arrêter le développement des germes :		Quantités de métal, en grs. par litre, adoptées pour nos essais bactériostatiques :
1° Quantités exprimées en ions métalliques :		
Colibacille	Staphylocoque doré	(résultats valables pour les deux germes)
Ag+ = 0 gr. 01288	0 gr. 01288	Ag+ phénol = 0 gr. 000644 « TH-Na = 0 gr. 00644 « CA-Na = 0 gr. 00644
Cu++ = 0 gr. 5208	0 gr. 3472	Cu++ = 0 gr. 0868
Mn++ = 0 gr. 6400	0 gr. 5600	Mn++ = 0 gr. 0800
2° Quantités exprimées en atomes-grammes :		
Colibacille	Staphylocoque doré	(résultats valables pour les deux germes)
Ag+ = $1{,}194\times10^{-4}$	1.194×10^{-4}	Ag+ phénol = $0{,}0596\times10^{-4}$ « TH-Na = $0{,}596\times10^{-4}$ « CA-Na = $0{,}596\times10^{-4}$
Cu++ = $81{,}92\times10^{-4}$	$54{,}61\times10^{-4}$	Cu++ = $13{,}65\times10^{-4}$
Mn++ = $116{,}51\times10^{-4}$	$101{,}94\times10^{-4}$	Mn++ = $14{,}56\times10^{-4}$

EN CONCLUSION :

1° L'ion Ag^+ s'est encore révélé ici le plus actif ; son influence affecte les trois substances organiques envisagées, aussi bien vis-à-vis du Colibacille que du Staphylocoque doré :

— Le phénol accuse un pouvoir antigénétique double ;

— Le thymolsulfonate de sodium qui, employé seul, est inactif même à la concentration de 12 gr. 80 pour mille, exerce une action bactériostatique aux concentrations de 7 gr. 68 vis-à-vis du Colibacille et 3 gr. 84 vis-à-vis du Staphylocoque doré, après intervention de Ag^+.

— Le carvacrolsulfonate de sodium manifeste également un renforcement assez sensible de son activité bactériostatique.

2° L'influence de Cu^{++} est moins profonde et plus irrégulière : le phénol et le thymolsulfonate de sodium sont légèrement activés tandis que le carvacrolsulfonate de sodium demeure inactif.

3° Enfin, le Mn^{++} s'avère le moins actif des trois ions métalliques.

(NOTA. — Deux cas d'exception ont été observés ; ils intéressent tous deux le phénol agissant sur le Staphylocoque doré : dans ce cas particulier, deux ions métalliques (le Cu^{++} et le Mn^{++}) diminuent le pouvoir antigénétique au lieu de l'augmenter.)

Certains ions métalliques sont donc susceptibles de renforcer, même à de très faibles doses, les pouvoirs bactéricide et bactériostatique de certaines substances organiques. Ces ions interviennent à des concentrations si faibles qu'il est impossible d'attribuer à leur activité propre les renforcements observés ; autrement dit, leurs effets se manifestent à des taux de dilution pour lesquels, employés seuls, ils sont absolument inefficaces. A ce point de vue, l'ion Ag^{+} a manifesté une influence remarquable et prépondérante.

Cette synergie renforçatrice demeure inexpliquée, mais sa signification pratique n'en est pas moins certaine.

BIBLIOGRAPHIE

1. — AGASSE-LAFONT : Les applications pratiques du Laboratoire à la Clinique - 1929, Vigot.
2. — BESSON et EHRINGER : La pratique de la désinfection - Baillière, 1926.
3. — A. BOIVIN et A. DELAUNAY : L'organisme en lutte contre les microbes - Gallimard, 6e édition.
4. — H. BONNET et A. NEVOT : Travaux pratiques de Bactériologie - Masson et Cie, 1942, Paris.
5. — CADEAC et MEUNIER : *Annales de l'Institut Pasteur* - 1186, III, p. 317.
6. — L. CAVEL : Sur la valeur antiseptique de quelques huiles essentielles - *C.R. Académie des Sciences*, 1918 - CLXVI, p. 827.
7. — P. CARNOT : Rapport sur l'état actuel de la question des antiseptiques - *C.R. de la Société de Biologie*, 81, 1918, p. 1.166.
8. — F. CAUJOLLE et MANS : Préparations antiseptiques à base d'essences végétales - *Société de Médecine de Toulouse*, 22 mai 1941.
9. — F. CAUJOLLE et C. FRANCK : Toxicité comparée du Thymol et du Carvacrol - Extrait du *Bulletin de la Société de Chimie Biologique* - Tome XXVI, juillet-septembre 1944, n° 7-9, pages 334-342.
10. — F. CAUJOLLE et C. FRANCK : Toxicité des p. Thymolsulfonates de sodium et de potassium - Extrait du *Bulletin de la Société de Chimie Biologique* - Tome XXVIII, n° 4-6, avril-juin 1946, p.p. 446-450.
11. — F. CAUJOLLE et C. FRANCK : Toxicité des p. Carvacrolsulfonates de sodium et de potassium - Extrait du *Bulletin de la Société de Chimie Biologique* - Tome XXVIII, nos 10-12, octobre-décembre 1946 p.p. 758-762.
12. — CHAMBERLAND : Les essences au point de vue de leurs propriétés antiseptiques. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1887, I. p. 153.
13. — DAKIN (H.-D.) and DUNHAM (E.-K.) : Manuel des antiseptiques, traduits par M. Daufresnes - Vigot, 1918.
14. — DEHAUT : Recherches sur le pouvoir antibactérien du Thymol, du Carvacrol et de quelques-uns de leurs dérivés - *Thèse Pharmacie* (Université) - Toulouse, 1944.
15 — DELBET et FIESSINGER : D'après Dujarric de la Rivière.

16. — DELCOURT-BERNARD (E.) : L'expertise des substances antiseptiques - *Revue d'Hygiène*, n° 6-7, juin 1926.

17. — DUCLAUX : Traité de Microbiologie - 3, 1900, Masson.

18. — DUJARRIC DE LA RIVIERE : La désinfection - *Le Mouvement Sanitaire*, 1925, p. 16.

19. — DURAND R. : Bactéries et médicaments antiseptiques - *Thèse de Pharmacie*, Nancy, 1919.

20. — EFFRONT J. : Sur le mécanisme de l'acclimatation des microorganismes aux substances toxiques - *Société de Biologie*, 83, 1920, p. 807.

21. — FIESSINGER-OLIVIER et HERBAIN : Les Diagnostics biologiques - Paris MCMXLIV - Maloine.

22. — FOURNEAU : Etat actuel de la Chimiothérapie - *Bulletin de la Soc. Chim. France*, 1925, IV[e] série, t. 37, p. I.

23. — D. GARDNER et M.-L. CASELLI : Propriétés biologiques du Carvacrol - *C.R. Académie des Sciences*, 1936, cc. p. 1.430.

24. — GATTEFOSSE : Antiseptiques essentiels - Girardot, Paris 1938.

25. — HEWLETT and TANNER : Désinfection and désinfectants - The Lancet, Marsh 13, 1909, p. 741 et Pharm. J. 31, 1910, p. 159.

26. — LAMBIN (S.) : Méthodes de mesures de l'activité antimicrobienne des substances chimiques - *Thèse de Doctorat es-Sciences* - 1933, Masson.

27. — LOEPER : Sulfamidothérapie - Masson et Cie, 1944 - Paris.

28. — MAILLARD : *C.R. de la Soc. de Biol.* 1898, Tome 5, 10[e] série, 1210-1212.

29. — A. MOREL et A. ROCHAIX : Recherches comparatives sur l'action microbicide de quelques essences végétales - *C.R. Société de Biologie*, 1921, LXXXV, p. 861.

30. — A. MOREL et A. ROCHAIX : Contribution à l'étude de l'action microbicide de quelques essences végétales - *Bulletin des Sciences pharmacologiques*, 1925, XXXII, p. 257.

31. — A. MOREL et ROCHAIX : Recherches sur le pouvoir fertilisant de quelques essences végétales. - *Bulletin des Sciences pharmacologiques*, 1928, XXXV, p. 631.

32. — A. MOREL et A. ROCHAIX : Sur la nature de propriétés microbicides des essences végétales et de leurs constituants définis. - *C.R. Société de Biologie*, 1929, CI. p. 1.152.

33. — MIQUEL et CAMBIER (R.) : Traité de Bactériologie - Masson, Paris.

34. — NICOLLE et JOUAN : Essai sur la valeur antiseptique d'un corps. *Cours de l'Institut Pasteur*, Legroux, 1923.

35. — A. PHILIBERT : Précis de Bactériologie médicale, 1931 - Masson

36. — POPOFF, d'après Duclaux, chap. XXVI : Variations de l'action antiseptique.

37. — Mme PORCHER-PIMPARD : Contribution à l'étude du pouvoir antiseptique des essences végétales - *Thèse Pharmacie*, 1942.

38. — REGNIER et LAMBIN : Contribution à l'étude de la mesure des valeurs antimicrobiennes des substances chimiques - *Bulletin de l'Académie de Médecine*, 105, 1931, n° 11.

39. — REGNIER et DAVID : Contribution à l'étude de la multiplication microbienne - *C.R. Académie des Sciences*, 193, 1931, pp. 1.119 et 1.487.

40. — ROCHAIX : Sur la théorie de la désinfection par les agents chimiques - *C.R. de la Soc. de Biologie*, 72, 1912, p. 322.

41. — ROCHAIX : Lois et théorie de l'action germicide des substances chimiques - *Revue d'Hygiène et de Police sanitaire*, 34, 1912, p. 266.

42. — TIFFENEAU (M.) : Désinfectants - Extrait du *Cours d'Hygiène de la Faculté de Médecine* - Masson, 1927.

QUESTIONS POSÉES PAR LA FACULTÉ

1° Hormones cortico-surrénales.

2° Problèmes actuels que doit résoudre le laboratoire dans les infections staphylococciques.

3° Vitamine B-12.

Vu, le Président de Thèse :
F. CAUJOLLE.

Vu, le Doyen :
LEFEBVRE.

Vu et permis d'imprimer,
Toulouse, le 9 mars 1951

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université :
DOTTIN.